

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002933

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 014 280.7
Filing date: 22 March 2004 (22.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 01 April 2005 (01.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

10 2004 014 280.7

Anmeldetag:

22. März 2004

Anmelder/Inhaber:

Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung:Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven
Aminosäuren mittels eines Ganzzellkatalysators**IPC:**

C 12 P, C 12 N

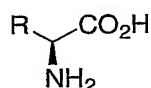
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Februar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

**Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren
mittels eines Ganzzellkatalysators**

Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung optisch aktiver L- α -Aminosäuren. Insbesondere beschreibt
5 die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



(I),

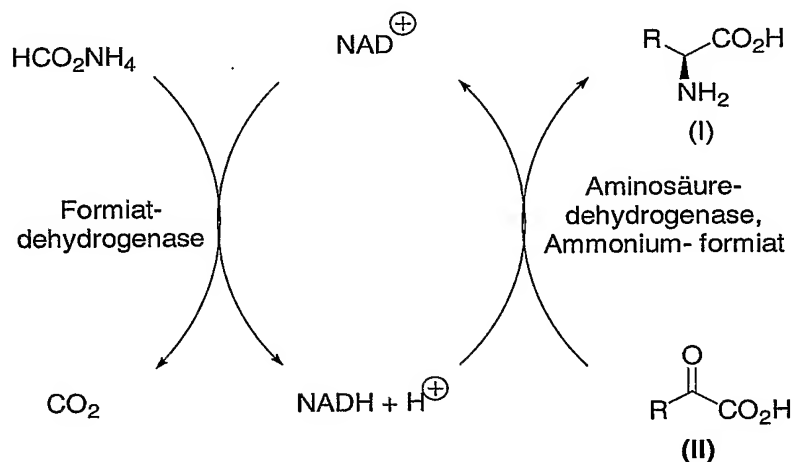
10 worin R für Alkyl, insbesondere eine raumerfüllende, verzweigte, ein tertiäres C-Atom aufweisende Alkylgruppe mit 5-10 C-Atomen, beispielsweise tert-Butyl, und substituierte Alkyl steht, bzw. daraus abgeleiteter Salze.

Optisch aktive L- α -Aminosäuren werden zur Herstellung einer
15 Reihe wertvoller Verbindungen eingesetzt. Beispielsweise fungieren diese Verbindungen als Intermediate bei der Herstellung von Pharmazeutika. Einen besonders wertvollen Vertreter dieser Produktklasse stellt L-tert-Leucin dar, das als Strukturelement in einer Reihe von Pharmawirkstoffen zu finden ist und demzufolge als Intermediat für die Synthese der entsprechenden Pharmawirkstoffe benötigt wird. Beispiele für Anwendungen von L-tert-Leucin als Baustein für Pharmawirkstoffe sind in A. S. Bommarius et al. (J. Mol. Cat. B: Enzymatic 1998, 5, 1-11) gegeben.

25 Die enzymatische Reduktion von 2-Ketocarbonsäuren mittels einer Leucindehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* unter in situ-Cofaktorregenerierung stellt eine technisch etablierte Methode zur Herstellung optisch aktiver L- α -Aminosäuren dar. Insbesondere eignet sich
30 dieser Weg zur Herstellung der nichtproteinogenen Aminosäure L-tert-Leucin, die im Tonnenmaßstab mit dieser

biokatalytischen Methode produziert wird. Das Verfahren ist eingehend in der Literatur beschrieben (EP0692538; U. Kragl, D. Vasic-Racki, C. Wandrey, Bioprocess Engineering 1996, 14, 291-297; A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, J. Mol. Cat. B: Enzymatic 1998, 5, 1-11; G. Krix, A. S. Bommarius, K. Kottenhahn, M. Schwarm, M.-R. Kula, J. Biotechnol. 1997, 53, 29-39, A. Liese, C. Wandrey, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, Industrial Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, S. 125f. und A. S. Bommarius, K. Drauz, W. Hummel, M.-R. Kula, C. Wandrey, Biocatalysis 1994, 10, 37-47. Eine allgemeine Übersicht ist zudem in A. S. Bommarius in: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Band 2, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, Kapitel 15.3, S. 1047f. gegeben).

15



Schema 1. Herstellung von L-tert-Leucin mit isolierten Enzymen und zugesetztem Cofaktor (am Beispiel einer NAD^+ -abhängigen Aminosäuredehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase zur Cofaktorregenerierung)

Typische verwendete NAD^+ -Cofaktormengen, die zugesetzt werden müssen, sind beispielsweise in EP0692538 beschrieben und liegen im Bereich von 0.0008 Äquivalenten bis 0.02 Äquivalenten. Zudem beschreiben G. Krix et al. (J. Biotechnol. 1997, 53, 29-39) die Herstellung von (S)-

Neopentylglycin in technischen Ansatzgrößen unter Einsatz einer NAD⁺-Cofaktormenge von 0.003 Äquivalenten. Typische Substratkonzentrationen in EP0692538 liegen bei 100 - 250 mM. In A. Liese et al. (Industrial Biotransformations, 5 Wiley-VCH, Weinheim, 2000, S. 125f.) ist die Herstellung von L-tert-Leucin mit einer Substratkonzentration von 0.5 M und einer Ausbeute von 74% beschrieben. Die Durchführung von reduktiven Aminierungen mit isolierten Leucindehydrogenase und Formiatdehydrogenase-Enzymen bei Substratkonzentrationen 10 von 0.5 bis 1 M ist ebenfalls in G. Krix et al. (J. Biotechnol. 1997, 53, 29-39) beschrieben.

Vorteilhaft bei diesem Verfahren sind die hohen Umsätze und hervorragenden Enantioselektivitäten, die bei >99% ee liegen und somit die strengen Qualitätsanforderungen an 15 Pharmaintermediate erfüllen helfen. Auch kann bei hohen Substratkonzentrationen gearbeitet werden, was gerade aus technischer Sicht ein bedeutender Aspekt ist.

Nachteilig beim bisherigen Verfahren ist allerdings zum einen der Bedarf an isolierten Enzymen. Diese werden 20 insbesondere in gereinigter Form eingesetzt, einhergehend mit einer Erhöhung des Biokatalysatorkostenanteils. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Enzymkosten ist ein vielfaches Recycling der Enzyme notwendig, um eine günstige Prozessökonomie, insbesondere niedrige Enzymkosten, zu 25 erhalten. Neben den langen Laufzeiten solcher Recyclingverfahren, die vorteilhaft in kontinuierlicher Form durchgeführt werden, sind auch die daraus resultierenden relativ kleinen Reaktionsvolumina pro Ansatz nachteilig.

Ein weiterer Nachteil ist der Bedarf an Cofaktor, der bei 30 der Reaktion zugesetzt wird. Solche Cofaktoren werden zwar nur katalytisch eingesetzt in Größenordnungen von ca. 0.001 Äquivalenten, stellen trotzdem aber aufgrund ihres hohen Preises selbst bei katalytischen Mengen einen erheblichen Kostenfaktor dar.

Wünschenswert wäre deshalb ein Verfahren, bei dem die Notwendigkeit des Einsatzes von isolierten Enzymen sowie des Zusatzes an Cofaktor entfällt bzw. der Zusatz an Cofaktor minimiert ist und die Synthese nichtsdestotrotz mit hoher Umsatzrate, hoher Enantioselektivität und hoher volumetrischer Produktivität verläuft. Auf diesem Wege könnten die Enzymkosten in nennenswerter Weise gesenkt, Cofaktorkosten eingespart und somit die Prozessökonomie gesteigert werden.

10 Soda et al. beschreiben die Verwendung eines Ganzzellkatalysators, enthaltend eine Leucindehydrogenase und eine bakterielle Formiatdehydrogenase, in der reduktiven Aminierung von unter anderem verzweigtkettige α -Ketocarbonsäuren wie L-tert-Leucin (Appl. Environm. Microbiology 1997, 63, 4651-4656.). Es wird explizit in dieser Veröffentlichung darauf hingewiesen, dass die bei der reduktiven Aminierung benötigten Enzyme in Form eines diese Enzyme aufweisenden Ganzzellkatalysators, insbesondere E. coli, als lebende oder "resting cells" eingesetzt werden können. Sofern man jedoch den intrazellularen Pool in E. coli an NAD^+ zwecks Vermeidung dessen Zugabe sich zunutze machen möchte, ist man auf eine finale Konzentration an Produkt von etwa 0,3 M beschränkt. Dies ist für technische Anwendungen nicht ausreichend genug.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Angabe eines weiteren enzymatisch arbeitenden Verfahrens zur Herstellung von L- α -Aminosäuren, welches vorteilhafterweise in technischem Maßstab durchgeführt werden kann. Es sollte insbesondere in den eben geschilderten Aspekten den Verfahren des Standes der Technik überlegen sein und es erlauben, die gewünschten Produkte unter prozessökonomischen Gesichtspunkten (insbesondere Raumzeitausbeute) vorteilhaft herzustellen.

Diese und weitere nicht näher spezifizierte sich jedoch aus dem Stand der Technik in naheliegender Weise ergebende

Aufgaben werden durch ein Verfahren mit den Merkmalen des vorliegenden Anspruchs 1 gelöst. Ansprüche 2 bis 9 sind auf bevorzugte Ausführungsformen des gegenständlichen Verfahrens gerichtet.

- 5 Dadurch, dass man in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten L- α -Aminosäuren oder deren Salzen durch Umsetzen der entsprechenden 2-Ketocarbonsäure mit einem Ammoniumionen-Donor in Gegenwart eines Ganzzellkatalysators aufweisend ein kloniertes Gen kodierend
- 10 für eine Cofaktor-abhängige Aminosäuredehydrogenase und ein kloniertes Gen kodierend für ein den Cofaktor regenerierendes Enzym bei einer Gesamteinsatzmenge an Substrat pro Reaktionsvolumen von ≥ 500 mM die Zugabe des Substrats so dosiert, dass die stationäre Konzentration an
- 15 2-Ketocarbonsäure unter 500 mM liegt und die externe Zugabe an Cofaktor bezogen auf die Gesamteinsatzmenge an Substrat $< 0,0001$ Äquivalenten entspricht, gelangt man in äußerst eleganter und überraschender dafür aber nicht minder vorteilhafter Art und Weise zur Lösung der gestellten
- 20 Aufgabe.
- Überraschenderweise gelingt es beispielsweise durch den Einsatz des Ganzzellkatalysators bei gleichzeitiger Dosierung des Substrats auf einen Zusatz des teuren Cofaktors zu verzichten bzw. durch minimale externe Zugabe
- 25 ($< 0,0001$ Äquivalenten) dessen Konzentrationen in einem geringen Bereich zu halten, was Prozesseinsatzkosten sparen hilft. Im Gegensatz dazu gelingt ohne diese Dosiertechnologie bei Vorlage von Substratmengen pro Reaktionsvolumina von > 500 mM die reduktive Aminierung mit
- 30 dem Ganzzellkatalysator nur, wenn größere Mengen des Cofaktors NAD⁺ zugesetzt werden. In dessen Abwesenheit verläuft die Konzentration nur unbefriedigend (siehe Vergleichsbeispiel „Synthesebeispiel 1“ Anfangssubstratmenge pro Reaktionsvolumina 900 mM - Endumsatz 25%). Erst durch
- 35 das erfindungsgemäße Verfahren (siehe Synthesebeispiel 2 bis 4) gelingt es somit, auf den externen Zusatz des Cofaktors

auch bei der Durchführung der Synthese mit höheren Gesamtumsatzmengen pro Reaktionsvolumina und damit bei prozessökonomisch sinnvollen Bedingungen fast vollständig verzichten zu können.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform wird demnach der teure Cofaktor nur in solchen Mengen zugegeben, dass eine Konzentration von vorzugsweise $<0,00005$ Äquivalenten, äußerst bevorzugt $<0,00001$ Äquivalenten bezogen auf das Substrat eingehalten wird. Ganz besonders bevorzugt ist ein
- 10 Ausführungsform bei der man keinen Cofaktor extern zur Reaktionsmischung hinzufügt. Hier kann also der Zusatz der Cofaktoren (z.B. NAD(H)) zur Gänze unterbleiben, was so aus dem Stand der Technik in naheliegender Weise nicht herleitbar war.
- 15 Der Fachmann ist im Rahmen der ins Auge gefassten Reaktion frei in der Wahl der Gene kodierend für eine Cofaktor-abhängige Aminosäuredehydrogenase und für ein den Cofaktor regenerierendes Enzym, die durch den Ganzzellkatalysator als Wirtsorganismus exprimiert werden sollen. Er wird sich
- 20 an Enzymen, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, orientieren.
- In Bezug auf die Aminosäuredehydrogenase kommen insbesondere Enzyme ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leucindehydrogenasen (US5854035) und
- 25 Phenylalanindehydrogenasen (US5416019) in Frage. Als Aminosäuredehydrogenasen haben sich insbesondere die Leucindehydrogenasen als geeignet erwiesen, wobei die Leucindehydrogenasen aus *Bacillus*-Stämmen und hier insbesondere aus *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus* (Seq.
- 30 ID No. 5) und *Bacillus stearothermophilus* im besonderen Maße geeignet sind.
- Als den Cofaktor regenerierendes Enzym können solche ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Formiatdehydrogenasen (EP1295937), Malatdehydrogenasen
- 35 (PCT/EP/03/08631), Lactatdehydrogenasen,

Glucosedehydrogenasen (letztere in A. Bommarius in: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Volume III, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, Kapitel 15.3) ins Auge gefasst werden. Als ganz besonders bevorzugt

5 hat sich die Verwendung einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bzw. daraus resultierender Mutanten (EP1295937; Seq. ID No. 7) unter Einsatz einer Formiat-haltigen Komponente als Substrat erwiesen.

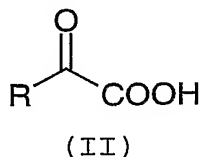
In besonderer Weise ist dabei ein Ganzzellkatalysator, der

10 eine Leucindehydrogenase sowie eine Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* oder daraus abgeleitete Mutanten enthält, geeignet.

Je nach eingesetzter Aminosäuredeshydrogenase ist das Substratsspektrum, welches durch den Ganzzellkatalysator

15 umgesetzt wird, unterschiedlich. Während die Leucindehydrogenase mehr für lineare und verzweigte aliphatisch substituierte 2-Ketocarbonsäuren in Frage kommt, wird die Phenylalanindehydrogenase bevorzugt auf aromatische substituierte Substrate angewandt. Im Hinblick auf den

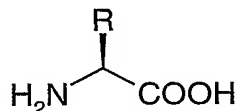
20 Einsatz von Leucindehydrogenase im Ganzzellkatalysator können bevorzugt Substrate der allgemeinen Formel (II) mit aliphatischem Rest R



eingesetzt und umgesetzt werden. Insbesondere kommen solche

25 in Frage, die sperrige aliphatische Reste als R aufweisen. Es sind dies vorrangig solche Reste R ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 1-Adamantyl, Neopentyl und tert-Butyl. Daher ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem man

2-Ketocarbonsäuren oder daraus resultierende Salze einsetzt, die Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)



(I)

5 worin R für Alkyl, insbesondere eine raumerfüllende, verzweigte, ein tertiäres C-Atom aufweisende Alkylgruppe mit 5-10 C-Atomen, beispielsweise tert-Butyl, und substituierte Alkyl steht, liefern.

10 Prinzipiell ist der Fachmann frei in der Art und Weise, wie er den erfindungsgemäßen Prozess durchführt. Er wird sich dabei an Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, orientieren. Diese Verfahren können kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Natur sein. Vorteilhaft ist die dosierte Zugabe des Substrats nach einem so genannten
15 Fedbatch-Prozess [siehe beispielsweise Synthesebeispiel 2 und 4] oder durch kontinuierliche Zugabe [siehe beispielsweise Synthesebeispiel 3]. Bei beiden Verfahrensvarianten erfolgt die Substratzugabe so, dass die stationäre Konzentration an Substrat unter 500 mM liegt.

20 Als vorteilhaft hat sich herausgestellt, wenn man die als Substrat eingesetzte 2-Ketocarbonsäure in einer maximalen stationären Konzentration von unter 450 mM und ganz besonders bevorzugt von unter 400 mM während der Reaktion einsetzt.

25 Beim Fedbatch-Verfahren erfolgt die Zugabe von Substrat, vorzugsweise als Substratlösung, portionsweise nach bestimmten Zeiteinheiten. Die Anzahl der zugegebenen Substratportionen liegt vorzugsweise zwischen 3 und 15, ganz bevorzugt zwischen 5 und 9. Die Konzentration der
30 zugegebenen Substratlösung ist vorzugsweise so hoch einzustellen, dass eine möglichst hohe Gesamteinsatzmenge an

Substrat pro Reaktionsvolumen erzielt wird. Beispiele für diese Verfahrensvariante des Fedbackth-Prozesses geben das Synthesebeispiel 2 und 4. Bei der kontinuierlichen Verfahrensvariante erfolgt die Substratzugabe kontinuierlich über einen bestimmten Zeitraum, vorzugsweise mit einer konstanten Dosiergeschwindigkeit, wobei das Substrat vorzugsweise in Form einer Substratlösung zugegeben wird. Ein Beispiel für diese kontinuierliche Verfahrensvariante gibt Synthesebeispiel 3.

10 Für den Ganzzellkatalysator, enthaltend eine Aminosäuredehydrogenase und ein zur Cofaktorregenerierung befähigtes Enzym, eignen sich sämtliche bekannte Zellen. Als Mikroorganismen sind diesbezüglich Organismen wie z.B. Hefen wie *Hansenula polymorpha*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces*
15 *cerevisiae*, Prokaryonten, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis* oder Eukaryonten, wie Säugerzellen, Insektenzellen oder Pflanzenzellen zu nennen. Die Verfahren zur Klonierung sind dem Fachmann wohlbekannt (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*,
20 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Vorzugsweise sind *E. coli*-Stämme für diesen Zweck zu benutzen. Ganz besonders bevorzugt sind: *E. coli* XL1 Blue, NM 522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10- , HB101, BL21 codon plus, BL21 (DE3) codon plus, BL21, BL21 (DE3),
25 MM294. Plasmide, mit denen das die erfindungsgemäße Nukleinsäure aufweisende Genkonstrukt vorzugsweise in den Wirtsorganismus kloniert wird, sind dem Fachmann ebenfalls bekannt (s.a. PCT/EP03/07148; s.u.).
Als Plasmide bzw. Vektoren kommen im Prinzip alle dem
30 Fachmann für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Ausführungsformen in Frage. Derartige Plasmide und Vektoren können z. B. von Studier und Mitarbeiter (Studier, W. F.; Rosenberg A. H.; Dunn J. J.; Dubendorff J. W.; (1990), *Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned*
35 *genes*, *Methods Enzymol.* 185, 61-89) oder den Broschüren der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech oder

Gibco BRL entnommen werden. Weiter bevorzugte Plasmide und Vektoren können gefunden werden in: Glover, D. M. (1985), DNA cloning: a practical approach, Vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goeddel, D. V. (1990), Systems for heterologous gene expression, Methods Enzymol. 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Plasmide, mit denen die die ins Auge gefassten Nukleinsäuresequenzen aufweisenden Genkonstrukte in ganz bevorzugter Weise in den Wirtsorganismus kloniert werden können, sind oder basieren auf: pUC18/19 (Roche Biochemicals), pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac2 (Roche Biochemicals), pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), pKK-233-3 (Stratagene) oder pET (Novagen).

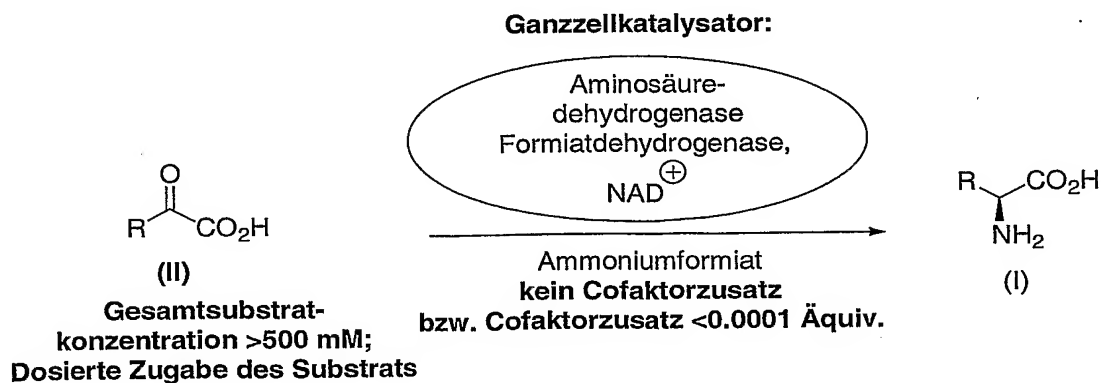
In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Ganzzellkatalysator vorzugsweise vor dessen Einsatz so vorbehandelt, dass die Permeabilität der Zellmembran für die Substrate und Produkte gegenüber dem intakten System gesteigert ist. Besonders bevorzugt ist dabei ein Verfahren, bei dem der Ganzzellkatalysator beispielsweise durch Einfrieren und/oder Behandlung mit Toluol vorbehandelt wird. Die Grundzüge des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in Schema 2 dargestellt.

Es lassen sich mit dem gegenständlichen Verfahren wie im Stand der Technik für den Einsatz der einzelnen Enzyme auch beschrieben die Substrate in außerordentlich hoher Konzentration einsetzen. Vorteilhaft ist hier der Einsatz der 2-Ketocarbonsäure in einer Konzentration von größer 500 mM. Weiter bevorzugt lässt sich das Substrat in Konzentrationen von größer 800 mM, bevorzugt größer 900 mM und ganz besonders bevorzugt von größer 1000 mM in die Reaktion einsetzen. Bei dieser Ausführungsform ist jedoch

der Zusatz von Cofaktor zur Redaktionsmischung essenziell, um entsprechende Umsatzraten zu erreichen.

Will man allerdings trotz geforderter hoher Raumzeitausbeute den Ganzzellkatalysator dergestalt einsetzen, dass kein externer Zusatz oder ein äußerst geringer externer Zusatz von unter 0,0001 Äquivalenten des teuren Cofaktors notwendig wird, so kann der Fachmann dies überraschenderweise mit der erfindungsgemäßen Dosierung des Substrats erreichen.

Bei der gegenständlichen Reaktion geht man bevorzugt so vor, dass man den Ganzzellkatalysator und den Ammoniumionen-Donor in Wasser vorlegt. Als Ammoniumionen-Donor kann jede dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommende Verbindung eingesetzt werden. Insbesondere sind dies Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus typischen Ammoniumsalzen. Ganz besonders bevorzugt kommt Ammoniumformiat zum Einsatz, wenn eine Formiatdehydrogenase als Cofaktor-Regenerierungssystem gewählt wird. Die Reaktion lässt sich an folgendem Schema 2 sehr anschaulich darstellen.



Schema 2. Reaktionsprinzip des erfindungsgemäßen Ganzzellkatalysatorverfahren (am Beispiel einer NAD^{+} -abhängigen Aminosäuredehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase zur Cofaktorregenerierung)

Werden statt der Leucindehydrogenase andere Dehydrogenasen eingesetzt, so können die Bedingungen unter denen das betreffende Enzym optimal funktioniert dem Stand der Technik

entnommen werden. Im Hinblick auf den Einsatz einer Phenylalanindehydrogenase wird auf die US5416019 und Galkin et al. (Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 4651) verwiesen.

Auf der Seite der Cofaktor-regenerierenden Enzyme und die einzustellenden Bedingungen kann auf die EP1295937 (Formiatdehydrogenase), PCT/EP/03/08631 (Malatdehydrogenase) und auf Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Volume III, Wiley-VCH, Weinheim, 2002 (Glucosedehydrogenase) und dort zitierte Literatur verwiesen werden.

Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren. Im Batch-Prozess kann die Biomasse durch Filtration oder Zentrifugation leicht vom Produkt abgetrennt werden. Die erhaltene Aminosäure kann dann nach gängigen Verfahren isoliert werden (Ionenaustauschchromatografie, Kristallisation).

Das gegenständliche Verfahren kann jedoch auch kontinuierlich durchgeführt werden. Dazu wird die Reaktion in einem so genannten Enzym-Membran-Reaktor durchgeführt, in dem hochmolekulare Stoffe - die Biomasse - hinter einer Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten werden und niedermolekulare Stoffe - wie die produzierten Aminosäuren - die Membran passieren können. Eine derartige Verfahrensweise wurde im Stand der Technik schon mehrfach beschrieben (Wandrey et al. in Jahrbuch 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI, S. 151ff; Kragl et al., Angew. Chem. 1996, 6, 684).

Das hier vorgestellte Verfahren zur Herstellung von insbesondere sperrigen Aminosäuren kann auf Grund seiner Vorteile sehr gut im kommerziellen Maßstab etabliert werden. Die überraschende Tatsache, dass der bei der ins Auge gefassten Reaktion notwendige Zusatz eines Cofaktors im erfindungsgemäßen Verfahren unterbleiben kann, sowie die Vorteile aus der leichten Handhabbarkeit der

Ganzzellkatalysatoren machen die nicht naheliegende Überlegenheit der vorliegenden Erfindung gegenüber den Verfahren des Standes der Technik aus.

Des weiteren kann als Überraschung gelten, dass der Einfluss unerwünschter stoffwechselphysiologischer Funktionen bei Einsatz des Ganzzellkatalysators keine Rolle spielt. Beides hilft in außerordentlich umfassender Art und Weise die Prozesskosten zur Herstellung der L- α -Aminosäuren zu senken.

Überraschend ist weiterhin, dass trotz Permeabilisierung der Zellwand und der damit verbundenen Möglichkeit eines Austretens des in den Zellen befindlichen Cofaktors eine zu erwartende negative Beeinträchtigung der Reaktion, beispielsweise durch Verminderung des Umsatzes, nicht beobachtet wird.

Unter optisch angereicherten (enantiomerenangereicherten, enantiomer angereicherten, enantiomerenreinen) Verbindungen wird im Rahmen der Erfindung das Vorliegen einer optischen Antipode im Gemisch mit der anderen in >50 mol-% verstanden.

Unter einem Ganzzellkatalysator wird ein Mikroorganismus verstanden, der klonierte Gene enthält, die für Enzyme kodieren, welche mindestens zwei konsekutive Transformationsschritte für eine organisch-chemische Verbindung katalysieren können. Diesbezüglich und im Hinblick auf die allgemeinen Herstellungsverfahren (Abstimmung der Enzymexpression im Hinblick auf die Umsetzungsraten) wird auf die EP1216304 verwiesen.

Unter Alkyl wird erfindungsgemäß ein (C₁-C₁₈)-Alkyl-Rest verstanden. Dieser umfasst lineare und beliebig verzweigte derartige Reste. Insbesondere sind mitumfasst Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, 1-n-Butyl-, 2-n-Butyl, 1- oder 2- Isobutyl, 1- oder 2- sec-Butyl-, tert-Butyl-, etc. Die Reste können einfach oder mehrfach mit (C₁-C₈)-

Heteroalkylresten oder Resten wie OH, SH, Hal, NH₂ substituiert sein. Unter Heteroalkylresten wird insbesondere verstanden ein wie oben dargestellter Alkyl-Rest mit ein bis acht C-Atomen, der Heteroatome wie O, S, N in seiner Kette enthält, oder über diese Heteroatome an das ins Auge gefasste Molekül gebunden ist.

Unter externer Zusatz an Cofaktor ist gemeint, dass diese Menge an Cofaktor künstlich zur Reaktionsmischung hinzugegeben wird. Sie ist additiv zu der Menge an Cofaktor zu sehen, die schon inhärent durch den Ganzzellkatalysator in Reaktionsmischung eingetragen wird.

Es versteht sich von selbst, dass die zur Reaktion eingesetzte 2-Ketocarbonsäure in der Reaktionsmischung in dissoziierter Form vorliegt. Diese Form kann erhalten werden entweder durch Einsatz der Ketocarbonsäure und einstellen eines entsprechenden pH-Wertes oder durch Zugabe der Salze der Ketocarbonsäuren. Beide Formen sind sinngemäß und erfindungsgemäß hier mitumfasst.

Der Terminus Gesamts substratkonzentration steht für die Gesamteinsatzmenge an Substrat pro Reaktionsvolumen.

Abbildungen:

Abb. 1 - pAM3.25 (Seq. ID No. 9):

Konstruktion von pJOE4580.2

Das Plasmid pJOE4580.2 entstand aus dem publizierten Plasmid
5 pJOE3075 (T.Stumpp, B.Wilms und J. Altenbuchner (2000)
Biospektrum 1/2000: 33-36) indem das *malE* Gen durch
Schneiden mit den Restriktionsendonuclease *NdeI*/*HindIII*
entfernt wurde und durch zwei Oligonucleotide ersetzt
wurden, die die *NdeI* und *HindIII* Schnittstellen wieder
10 komplementierten und dazu noch eine *NheI*, *AatII* und *PstI*
Schnittstelle trugen. In die *NheI* Schnittstelle wurde nach
Auffüllen mit Klenow Polymerase und dNTPs ein *SmaI* Fragment
eingefügt aus dem Plasmid pJOE773 (J. Altenbuchner, P.
Viell, I. Pelletier (1992) Positive selection vectors based
15 on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol* 216: 457-
466.), das das *lacZ*alpha Gen aus *E. coli* trägt. *E. coli*
JM109 mit diesem Plasmid zeigt auf LB-platten mit X-Gal und
IPTG blaue Kolonien. Dieses Plasmid wurde pJOE4580.2
genannt. In dieses wurde die *FDH*-Sequenz (Seq. ID No. 7)
20 kloniert. Es wurde pAM3.25 genannt.

Abb. 2 - pAM5.22

Konstruktion von pJOE4580.2

Das Plasmid pJOE4580.2 entstand aus dem publizierten Plasmid
25 pJOE3075 (T.Stumpp, B.Wilms und J. Altenbuchner (2000)
Biospektrum 1/2000: 33-36) indem das *malE* Gen durch
Schneiden mit den Restriktionsendonuclease *NdeI*/*HindIII*
entfernt wurde und durch zwei Oligonucleotide ersetzt
wurden, die die *NdeI* und *HindIII* Schnittstellen wieder
30 komplementierten und dazu noch eine *NheI*, *AatII* und *PstI*
Schnittstelle trugen. In die *NheI* Schnittstelle wurde nach
Auffüllen mit Klenow Polymerase und dNTPs ein *SmaI* Fragment

eingefügt aus dem Plasmid pJOE773 (J. Altenbuchner, P. Viell, I. Pelletier (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. Methods Enzymol 216: 457-466.), das das lacZalpha Gen aus E. coli trägt. E. coli JM109 mit diesem Plasmid zeigt auf LB-platten mit X-Gal und IPTG blaue Kolonien. Dieses Plasmid wurde pJOE4580.2 genannt. In dieses wurde die LeuDH-Sequenz (Seq. ID No 5) insertiert. Das neue Plasmid heißt pAM5.22.

10 Abb. 3 - pAM8.21

Konstruktion von pHWG640.12 (Seq. ID No. 11)

Das Plasmid pHWG640.12 ist bisher nicht publiziert, so dass die Konstruktion nachfolgend beschrieben wird. Die Konstruktion dieses Plasmids pHWG640.12 erfolgt ausgehend vom publizierten Plasmid pAW229 in leicht nachvollziehbarer Weise. Das Plasmid pAW229 ist ein pACYC184 Derivat mit Rhamnosepromotor. Ausgehend von pAW229 (B. Wilms, A. Wiese, C. Syldatk, R. Mattes, J. Altenbuchner (2001) J. Biotechnol 86:19-30) wurde das hyuC-Gen mit NdeI/HindIII aus dem Plasmid ausgeschnitten und durch ein PCR Fragment ersetzt, das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten war und das das scfA Gen (malic enzyme) von E. coli K12 enthält. Das so entstandene Plasmid wurde als pHWG640.12 bezeichnet. In dieses wurde die LeuDH-Sequenz insertiert. Das neue Plasmid heißt pAM8.21.

Abb. 4 - pAM10.1 (Seq. ID No. 10)

Im Plasmid pAM8.21 wurde das scfA-Gen (Seq. ID No 11) deletiert. Das neue Plasmid heißt pAM10.1

Abb. 5

Biokatalysators mit Darstellung des Verlaufs der
spezifischen Aktivität an Leucindehydrogenase (LeuDH) und
Formiatdehydrogenase (FDH) sowie der optischen Dichte in
5 Abhängigkeit von der Induktionszeit; Zur Beschreibung der
Fermentationsbedingungen im Detail, siehe Experimenteller
Teil.

Experimentelle Beispiele

Herstellung des Ganzzellkatalysators

Genamplifikation und Klonierung

5 Zur Klonierung der Formiatdehydrogenase (FDH, *fdh3* aus *Candida boidinii*, Mutante mit geringerer Oxidationsempfindlichkeit) und Leucindehydrogenase (LeuDH aus *Bacillus cereus*) für die Ganzzellkatalyse der Umsetzung von Trimethylpyruvat zu tert-Leucin mit Cofaktorregenerierung wurden die Gene beider Enzyme zunächst mit PCR aus chromosomaler DNA der oben genannten Stämme amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgelistet, die Zusammensetzung der PCR-Ansätze in Tabelle 2 und das PCR-Programm in Tabelle 3.

15 Tabelle 1: Oligonucleotide für die Genamplifikation von FDH und LeuDH

Oligo-nucleotid	Sequenz 5' - 3'		Seq. ID No.
s3713	AAA AAA <u>CTT AAG</u> AAG GAG ATA TAC ATA TGA CAT TAG AAA TCT TCG AA	LeuDH forward	1
s3714	AAA AAA <u>CTG CAG</u> TTA GCG ACG GCT AAT AAT AT	LeuDH reverse	2
s3723	AAA AAA <u>CAT ATG</u> AAG ATT GTC TTA GTT CTT	FDH forward	3
s3716	AAA AAA <u>GAC GTC</u> TTA TTT CTT ATC GTG TTT ACC	FDH reverse	4

Mit den Oligonucleotiden wurden den Genen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angehängt. Diese sind für s3713 -

BfrI, für s3714 - PstI, für s3723 - NdeI und s3716 - AatII
(siehe unterstrichene Bereiche).

5 Tabelle 2: PCR-Ansätze, Polymerase, Puffer und $MgCl_2$ stammen
von der Firma Biomaster, die DNA-Ausgangskonzentration der
Plasmid-DNA betrug 50 μ g/ml

Komponente	für FDH	Ansatz für FDH	für LeuDH	Ansatz für LeuDH
Plasmid-DNA aus Stamm FDH- C235/C262A		2 μ l	Plasmid- DNA pLeu2	2 μ l
10x Puffer		10 μ l		10 μ l
50mM $MgCl_2$		3 μ l		3 μ l
100% DMSO		10 μ l		10 μ l
10mM dNTPs		2 μ l		2 μ l
33mM Oligo 1	s3723	1 μ l	s3713	1 μ l
33mM Oligo2	s3716	1 μ l	s3714	1 μ l
Taq-Polymerase		1 μ l		1 μ l
VE H2O		70 μ l		70 μ l

Tabelle 3: PCR-Programm: die Schritte 2 bis 4 wurden 30mal wiederholt

Schritt	T, t für FDH-Amplifikation	T, t für LeuDH-Amplifikation
1. Denaturierung der DNA	94°C, 5min	94°C, 5min
2. Oligo-Annealing	50°C, 1min	51°C, 1min
3. DNA-Elongation	72°C, 1:30min	72°C, 1:30min
4. Denaturierung der dsDNA	92°C, 1min	92°C, 1min
5. DNA-Elongation	72°C, 7min	72°C, 7min

5 Nach der Genamplifikation wurden die PCR-Fragmente mit den „DNA PCR and Gelband Purification Kit“ der Firma GFX aufgereinigt und in die L-Rhamnose-induzierbaren Vektoren pJOE4580.2 (pBR322-Derivat; Abb. 1) bzw. pHWG640.12 (pACYC184-Derivat; Abb. 3; Seq. ID No. 11) mit Hilfe der unten genannten Restriktionsendonucleasen ligiert.

10 Restriktionsansätze wurden im allgemeinen mit circa 50µg/ml DNA im 10µl Standardansatz gemacht. Zugegeben wurde weiterhin 1µl des ersten Enzyms sowie 1µl des 10x konzentrierten Enzympuffers. Die Ansätze wurden mit VE H2O auf das Endvolumen eingestellt. Die zu inserierende DNA
 15 wurde getrennt von der Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen inkubiert. Nach der Restriktion mit dem ersten Enzym erfolgte ein Fällungsschritt, in dem die DNA mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 8µl TE 10.01 aufgenommen wurde. Zu diesen
 20 Ansätzen wurde jeweils 1µl des zweiten Enzyms und 1µl des zweiten 10x Enzympuffers gegeben und diese Ansätze erneut 1,5h bei 37°C inkubiert. Bei der Herstellung des Vektors

pAM10.1 aus pAM8.21 folgte zudem eine Behandlung mit Klenow-Polymerase. Dann wurde die DNA durch ein 1%iges Agarose-Gel (Seakem-Agarose mit 0,4µg/ml Ethidiumbromid) in ihre Fragmente aufgetrennt und die richtigen Banden mit einem Skalpell für die Weiterverwendung ausgeschnitten. Die DNA wurde aus den Gelblöckchen mit dem „EASY PURE Gel Purification Kit“ der Firma Biozym nach Anleitung eluiert und in 15µl TE 10.01 aufgenommen.

Für die Ligation von Vektor und Insert wurden die Ansätze so gewählt, dass die Insert-DNA etwa die doppelte Konzentration des Zielvektors erreichte. Auch hier betrug die DNA-Konzentration circa 50 µg/ml. Endvolumen für die Ligationsansätze war 10µl, die neben dem Vektor-Insert-Gemisch auch 1µl Ligase und 1µl 10x konzentrierten Ligasepuffer (beides von ROCHE) enthielten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Ligationsansätze wurden in E. coli K12 JM109 transformiert, auf LB-Agar mit Antibiotika (100µg/ml Ampicillin (pAM3.25 [Seq. ID No. 9], pAM5.22) oder 25µg/ml Chloramphenicol (pAM8.21, pAM10.1 [Seq. ID No. 10]) selektiert und Klone nach Plasmidisolierung auf das zu erwartende Plasmid kontrolliert.

Da zu Anfang LeuDH (Seq. ID No. 6) mit Malic Enzyme (Seq. ID No. 12) gekoppelt werden sollte, wurde das LeuDH Gen zuerst in pJOE4625.1 inseriert, das bereits das Gen für Malic Enzyme (sfcA) enthielt (Abb. 2). Anschliessend wurde das LeuDH Gen in pHGW640.12 (Abb. 3) inseriert, einem pACYC184 Derivat, ebenfalls mit Rhamnosepromotor und sfcA Gen, das dann deletiert wurde. Die Umklonierung des LeuDH-Gens vom Plasmid pAM5.22 (Abb. 2) auf das Zielplasmid pAM10.1 (Abb. 4) war notwendig zur Erstellung eines Zweiplasmidsystems, dass zur Selektion zwei Resistenzmarker benötigt.

Tabelle 4: Klonierungsergebnisse

Gen/ Vektor	kloniert in Plasmid	Restriktion mit	neue Bezeichnung	Abb.
PCR-Fragment FDH	pJOE4580.2	NdeI, AatII	pAM3.25	1
PCR-Fragment LeuDh	pJOE4625.1	BfrI, PstI	pAM5.22	2
LeuDh aus pAM5.22	pHWG640.12	BfrI, BamHI	pAM8.21	3
pAM8.21	Ohne scfA-Gen	MunI, PstI	pAM10.1	4

Fermentation des Ganzzellkatalysators

Nachdem die Kombination FDH/LeuDh (*E. coli* JM109/pAM3.25/pAM10.1) bei Versuchen im Miniaturmaßstab (1ml) im Thermoschüttler durch HPLC-Analyse die besseren Umsatzergebnisse von Trimethylpyruvat zu tert-Leucin als ein Vergleichsmodellsystem (Malic Enzyme/LeuDh auf pAM5.22) erreichte, wurden die Plasmide pAM3.25 und pAM10.1 in *E. coli* BW3110 transformiert, da dieser für Fermentationen geeigneter ist. Durch die Hochzelldichtefermentation sollte eine genügend große Biomasse für alle folgenden Untersuchungen mit dem Modellsystem hergestellt werden. Die Fermentation erfolgte ohne Antibiotikum, die Vorkulturen wurden mit Antibiotikum angezogen, in einem 30l-Fermentor mit 8l Endvolumen bei 30°C. Die Zellen wurden dazu zunächst als Batchkultur bei 30°C angezogen bis zu einer OD600=50 und einem vollständigen Verbrauch der Glucose (ca. 22h). dann erfolgte die Genexpressionsinduktion durch Zugabe von sterilfiltrierter Rhamnose mit einer Endkonzentration von 0,2% sowie der Start als Fedbatchkultur durch automatische

Zugabe von Nährlösung und Mineralien (Feed I und Feed II).
Ab der Induktion wurden alle zwei Stunden Proben genommen,
von denen die OD und die Enzymaktivitäten mit den jeweiligen
Aktivitätstests bestimmt wurden. In der Abbildung 5 sind der
5 Verlauf der OD sowie der Aktivitäten bis zum
Fermentationsabbruch gegen die Zeit aufgetragen.

Die Fermentation wurde 22h nach der Rhamnoseinduktion
abgebrochen, da die Aktivität der FDH trotz zunehmender
Zelldichte stagniert war und die Ursache dafür vermutlich
10 ein Plasmidverlust oder zu saures Reaktionsmilieu war.
Letzteres machte sich bemerkbar bei den Ganzzellumsetzungen,
bei denen der pH-Wert im Vergleich zu einer vorher pH-
regulierten Lösung bei Zugabe der Biofeuchtmasse deutlich
absank ($\Delta \text{pH}_{\text{max}}=0,8$). Die Aktivitäten der beiden Enzyme
15 erreichten 0,565U/mg Gesamtprotein für die LeuDH und
0,123U/mg Gesamtprotein für die FDH. Die Volumenaktivitäten
bezogen auf das Fermentationsmedium ergaben für die LeuDH
32,77U/ml und 7,14U/ml für die FDH. Die Zellausbeute nach
dem Entfernen des Mediums in einem Separator ergab 1,4kg
20 Biofeuchtmasse. Die Zellen wurden bei -20°C bis zum Einsatz
als Ganzzellkatalysator zwischengelagert.

Fermentationsmedien

Vorkultur: 2x200ml

25 Vorkulturmedium: $\text{cNa}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} = 2\text{g/l}$

$\text{c}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 2,675\text{g/l}$

$\text{cNH}_4\text{Cl} = 0,5\text{g/l}$

$\text{cK}_2\text{HPO}_4 = 14,625\text{g/l}$

$\text{cNaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} = 3,6\text{g/l}$

30

Autoklavieren in 90vol% H_2O

cGlucose=10g/l Endkonzentration
(Stocklösung, in H₂O)

Getrennt autoklavieren

1M MgSO₄-Lösung 2ml/l

5 TES 3ml/l

Thiamin-Stammlösung (10g/l in H₂O) 1ml/l

Batchkultur: Inokulum (380ml mit Cx=12g/l) mit Glucose, MgSO₄, TES und Thiamin in einem Animpfkolben zum autoklavierten Batchmedium zugeben

10 Batchmedium (Einwaage für 8l):

Na₂SO₄x10H₂O 16g

(NH₄)₂SO₄ 21,4g

NH₄Cl 4g

K₂HPO₄ 117g

15 NaH₂PO₄x2H₂O 28,8g

(NH₄)₂H-Citrat 8g

in 7.5l H₂O lösen und im 30l-Fermenter
sterilisieren

Glucose-Monohydrat 220g

20 in 500ml H₂O lösen und autoklavieren (25g/l)

1M MgSO₄-Lösung 16ml

TES 24ml

Thiamin-Lösung (10g/l) 8ml

(Thiamin sterilfiltrieren, Rest autoklavieren)

25 pH-Wert 7,2 mit H₃PO₄ und NH₃

Fedbatch-Feed:

I. Glucose-Monohydrat 2750g in 3,5l H₂O

autoklavieren

30 MgSO₄x7H₂O 98,5g in 0,15l H₂O

autoklavieren

TES-Lösung 0,5l

autoklavieren

Thiamin 2,5g in 0,05l H₂O

sterilfiltrieren

anschließend vereinigen in einem Zulaufkolben

- 5 II. (NH₄)₂HPO₄ 396g in 1l H₂O, pH7
autoklavieren

Feed I und II werden mittels zwei getrennten Pumpen
zugegeben

10 pH-Wert: 7.2 (titriert mit H₃PO₄ und NH₃)

pO₂: ca. 50kPa (reguliert durch Rührerdrehzahl)

15	Spurenelemente-Lösung (TES):	CaCl ₂ x2H ₂ O	0,5g
		ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,18g
		MnSO ₄ xH ₂ O	0,1g
		Di-Na-EDTA	20,1g
		FeCl ₃ x6H ₂ O	16,7g
		CuSO ₄ x5H ₂ O	0,16g
		CoCl ₂ x6H ₂ O	0,18g
20		H ₂ O ad 1l	

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei 900 mM ohne Dosierung (Vergleichsbeispiel = Synthesebeispiel 1)

Es werden zu 5.85 g des Biokatalysators (Biomasse *E. coli* JM105(pAM 3.25_10.1)) und 7.95 g Ammoniumformiat (2.8 mol-Äquivalente) 50 mL einer 0.9 M

Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak), die zugleich 1 mM Magnesiumchlorid und 1%(v/v) Toluol enthält, gegeben. Der pH-Wert wird zu Beginn der Reaktion auf pH7.0 nachgestellt und danach nicht weiter reguliert, so dass der pH-Wert während der Reaktion ansteigt. Die Reaktionstemperatur beträgt 30 °C. Nach 8 h Reaktionszeit wird ein Umsatz von 24.6% gemessen, der auch nach weiteren 15 h Rühren nicht mehr gesteigert werden kann.

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei ca. 0,9 M mit Fedbatch-Dosierung (Synthesebeispiel 2)

Es werden zunächst in einem 250L-Dreihalskolben 23,84 g Ammoniumformiat (entsprechend 2.8 Äquivalenten bezogen auf die gesamte eingesetzte Substratmenge) und 17.55 g des Biokatalysators (Biomasse *E. coli* JM105(pAM 3.25_10.1)) eingewogen und dazu 28.50 mL VE-Wasser sowie 150 µL einer 1M Magnesiumchloridlösung (entsprechend einer 1 mM

Konzentration bezogen auf das Endvolumen) hinzugefügt. Bei Erreichen der Reaktionstemperatur von 30 °C wird durch Zugabe von 7,50 mL einer 1.8 M

Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak) die Reaktion gestartet. Der pH-Wert wird anschließend durch Zugabe von 32%-igem Ammoniak auf pH 7.0

gestellt. Anschließend werden nach in definierten Zeitabständen zunächst zweimal jeweils 7.50 mL einer 1.8 M Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak), sowie anschließend fünfmal unterschiedliche Volumina einer 1.8 M

Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak) zudosiert. Die Zeitabstände sowie die jeweils zudosierten Mengen sind in nachfolgender Dosiertabelle angegeben. Das Endvolumen beträgt 150 mL und die Gesamtkonzentration an eingesetztem Substrat beträgt 0.86 M, entsprechend einer volumetrischen Menge an Trimethylbrenztraubensäure von 112.5 g/L. Nach 24 h Reaktionszeit wird ein vollständiger Umsatz (>98% gemäß HPLC) beobachtet.

10

Dosiertabelle	Substratlsg.	Substratlsg.
Zeit (h)	ml (1,8M)	ml (0,9M)
0	7,5	0
0,5	7,5	0
1	7,5	0
2,5	0	15
4	0	17,5
5,5	0	20
6,5	0	22,5
7	0	24
Gesamtvolumen an zudosierter Substratlösung	22,5	99

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei 1 M mit kontinuierlicher Dosierung (Synthesebeispiel 3)

Es werden zunächst in einem 250L-Dreihalskolben 26.48 g Ammoniumformiat (entsprechend 2.8 Äquivalenten bezogen auf die gesamte eingesetzte Substratmenge), 150 µL einer 1M Magnesiumchloridlösung (entsprechend einer 1 mM Konzentration bezogen auf das Endvolumen) und 19.49 g des Biokatalysators (Biomasse E. coli JM105(pAM 3.25_10.1) eingewogen und dazu 30 mL VE-Wasser hinzugefügt. Der pH-Wert wird anschließend durch Zugabe von 32%-igem Ammoniak auf pH 7.0 gestellt. Bei Erreichen der Reaktionstemperatur von 30 °C gibt man kontinuierlich mit einem Flow von 0.2 mL/min über einen Zeitraum von 10 Stunden insgesamt 120 mL einer 1.25 M Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak) zu. Das Endvolumen beträgt 150 mL und die Gesamtkonzentration an eingesetztem Substrat beträgt 1.0 M, entsprechend einer volumetrischen Menge an Trimethylbrenztraubensäure von 130.1 g/L. Nach 27 h Reaktionszeit wird ein Umsatz von 96% (gemäß HPLC) beobachtet.

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei 700 mM mit Fedbatch-Dosierung

In ein konisch geformtes 100ml Reaktionsgefäß eines STAT Titrino 718 werden zuerst 2,55g Natriumformiat (entspricht 2,5mol/l bezüglich Endvolumen) gegeben, 15µl einer 1M MgCl₂-Lösung (entspricht 1mM Endkonzentration) zugesetzt und 4,5ml einer 1M TMP-Lösung (pH7 mit 25%igem Ammoniak eingestellt) sowie 1,5vol% Toluol (bezüglich Endvolumen) zugegeben. Das Volumen wird mit VE H₂O auf 15ml aufgefüllt. Die Reaktionstemperatur von 30°C wird durch einen Wasserkreislauf stabil gehalten und kontrolliert. Vom Biokatalysator wurde 1g Biofeuchtmasse im Substratgemisch

resuspendiert und der pH-Wert mit 25%igem Ammoniak auf pH6,9 bis pH7 eingestellt.

Nach Erreichen von pH7,5 werden wiederholt 4,5ml der 1M TMP-Lösung (pH7) zugegeben. Der pH-Wert sinkt dabei um ca.

5 $\Delta pH=0,3$. Sobald pH7,5 erreicht wird, erfolgt erneut die

Zugabe von 4,5ml 1M TMP-Lösung. Die Zugabe von TMP im genannten Volumen wird 10x wiederholt bis der pH-Wert sich bei der Zugabe von TMP nicht mehr nach unten verändert. Bei der achten Zugabe von TMP erfolgt außerdem die Zugabe von

10 4ml 4M Natrium-Formiatlösung (entspricht ohne Berücksichtigung eines Umsatzes einer Konzentration von 973mM im Medium). Das Endvolumen beträgt 64ml mit einer volumetrischen Endkonzentration (ohne Berücksichtigung des Umsatzes) von Trimethylbrenztraubensäure von 774mM

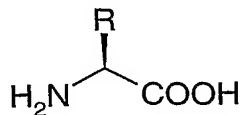
15 (100,6g/l). Natriumformiat liegt mit einer Endkonzentration von 836mM in der Lösung vor. Nach bereits 6h konnte durch HPLC ein Umsatz von Trimethylbrenztraubensäure von 92% beobachtet werden.

In der folgenden Tabelle 5 sind die Konzentrationen beider Substrate zu den verschiedenen Zugabepunkten aufgelistet.

Zeitpunkt [t in min]	Konzentration Trimethylbrenz- traubensäure [mM]	Konzentration Natriumformiat [mM]	zweite Natriumformiat -zugabe
0	300	2500	
45	461,54	1923,08	
60	562,5	1562,5	
75	631,58	1315,79	
90	681,82	1136,36	
105	720	1000	
120	750	892,86	
135	774,19	806,45	
150	736,36	972,73	x
180	756,30	899,16	
210	773,44	835,94	

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten L- α -Aminosäuren oder deren Salzen durch Umsetzen der entsprechenden 2-Ketocarbonsäure mit einem Ammoniumionen-Donor in Gegenwart eines Ganzzellkatalysators aufweisend ein kloniertes Gen kodierend für eine Cofaktor-abhängige Aminosäuredehydrogenase und ein kloniertes Gen kodierend für ein den Cofaktor regenerierendes Enzym bei einer Gesamteinsatzmenge an Substrat pro Reaktionsvolumen von ≥ 500 mM, wobei die Zugabe des Substrats so dosiert wird, dass die stationäre Konzentration an 2-Ketocarbonsäure unter 500 mM liegt und die externe Zugabe an Cofaktor bezogen auf die Gesamteinsatzmenge an Substrat $< 0,0001$ Äquivalenten entspricht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man keinen Cofaktor zur Reaktionsmischung zusetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man solche 2-Ketocarbonsäuren einsetzt, die Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)



(I)

worin R für Alkyl, insbesondere eine raumerfüllende, verzweigte, ein tertiäres C-Atom aufweisende Alkylgruppe mit 5-10 C-Atomen, beispielsweise tert-Butyl, und substituierte Alkyl steht, liefern.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

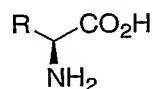
dadurch gekennzeichnet, dass
die Zudosierung des Substrats nach einem Fedbatch-
Verfahren erfolgt.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden
5 Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
man die 2-Ketocarbonsäure in einer maximalen
stationären Konzentration von unter 450 mM, ganz
bevorzugt von unter 400 mM hält.
- 10 6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
man den Ganzzellkatalysator vor dessen Einsatz so
vorbehandelt, dass die Permeabilität der Zellmembran
15 für die Substrat und Produkte gegenüber dem intakten
System gesteigert ist.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von insbesondere enantiomerenangereicherten L- α -Aminosäuren, insbesondere solche der allgemeinen Formel

5 (I).



(I)

Das erfindungsgemäße Verfahren geht dabei von 2-Ketocarbonsäuren aus, die durch einen Ganzzellkatalysator aufweisend eine Aminosäuredehydrogenase und ein Cofaktor-regenerierendes Enzym zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden.

10

Abb. 1

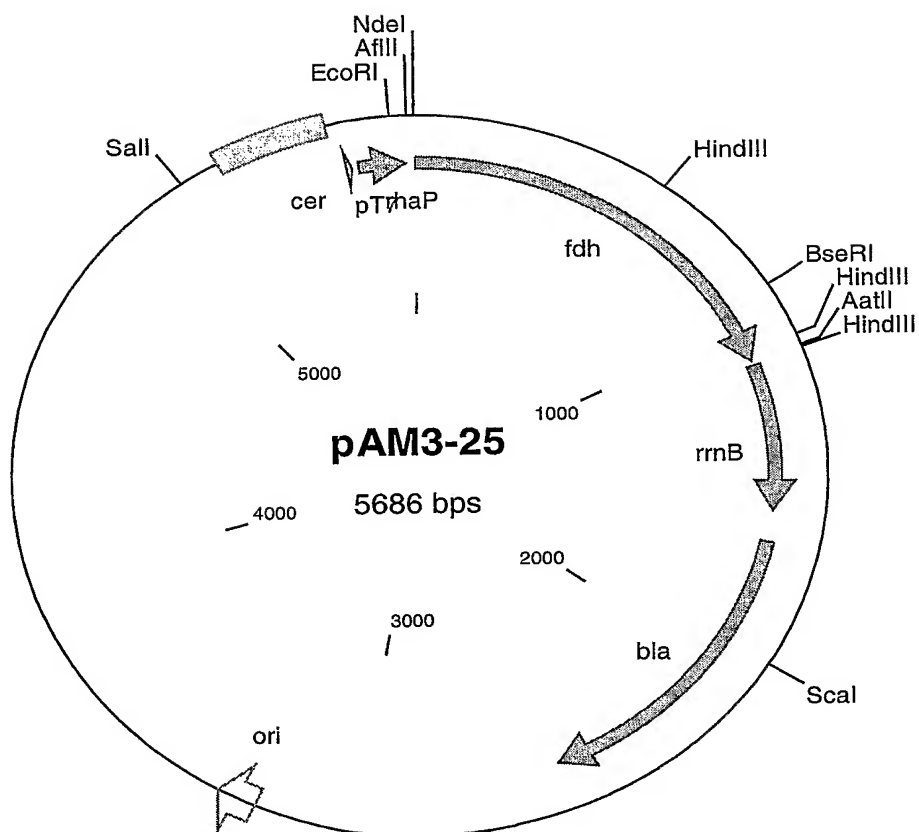


Abb. 2

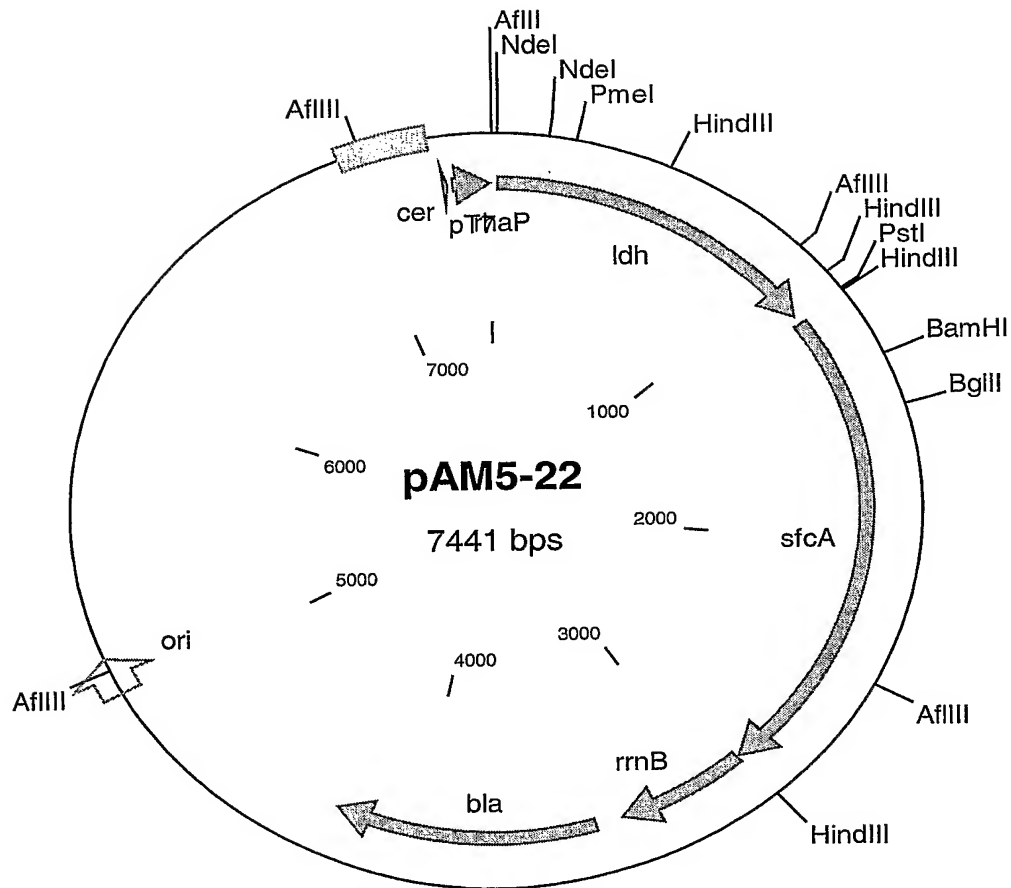


Abb. 3

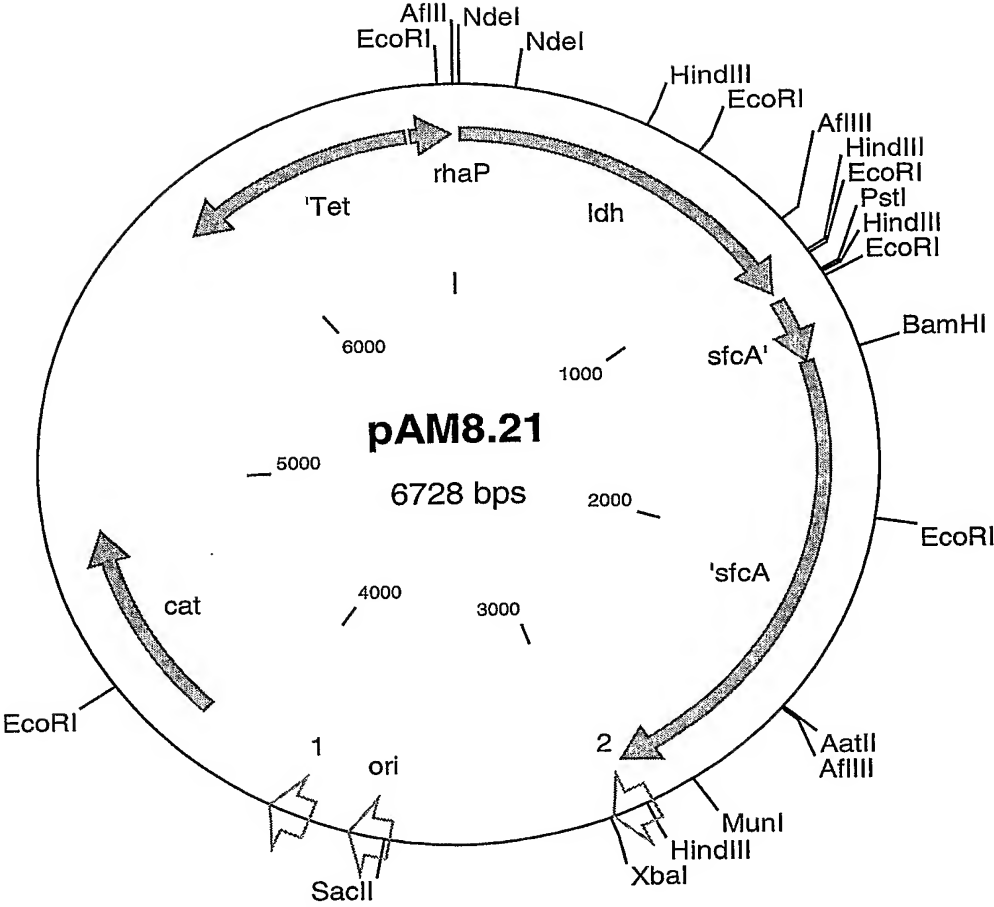


Abb. 4

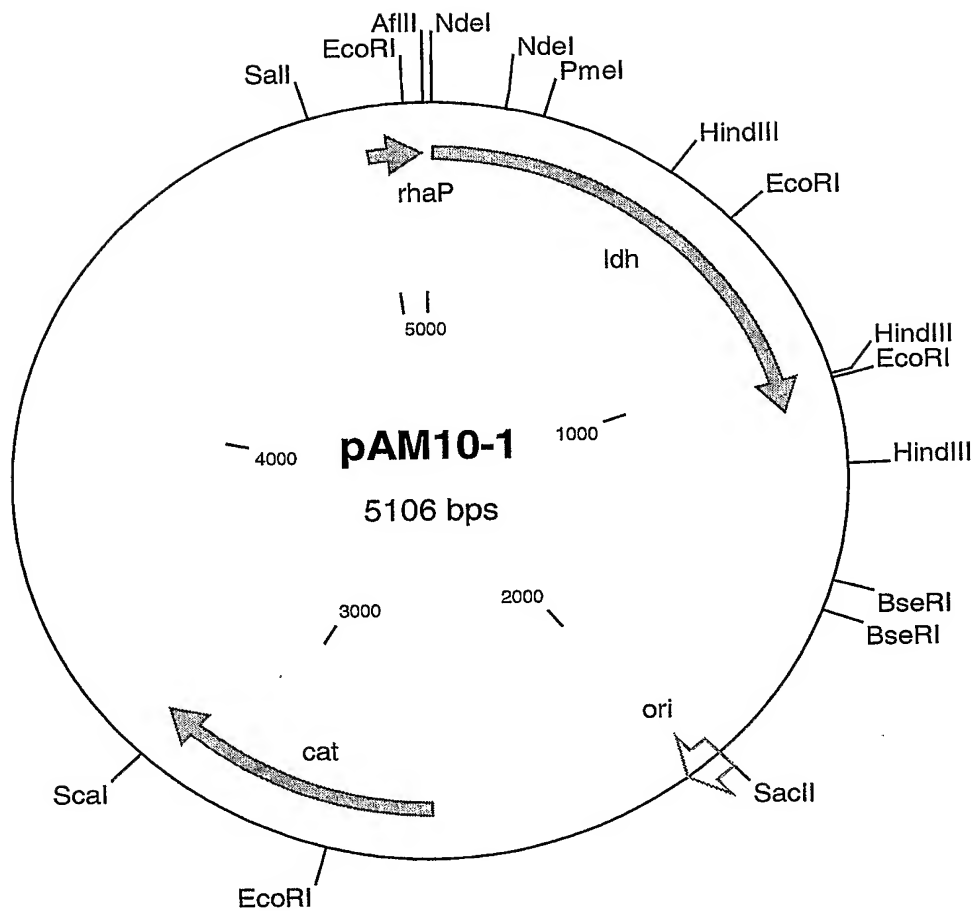
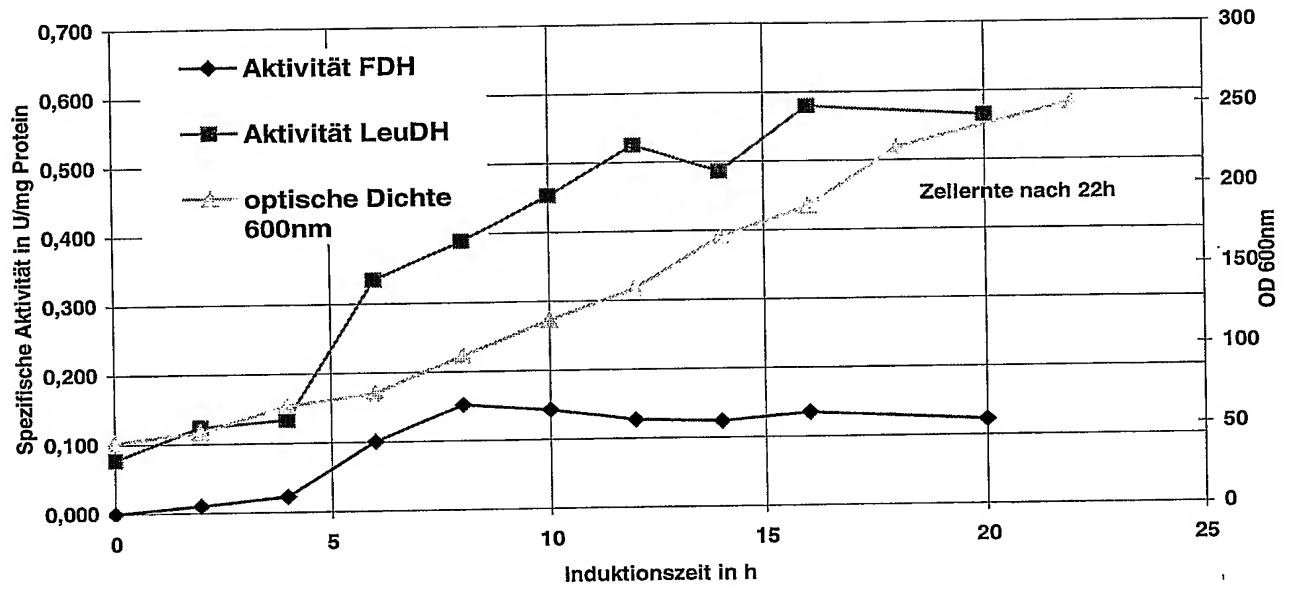


Abb. 5



SEQUENCE LISTING

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren mittels
eines Ganzzellkatalysators

<130> 040055 AM

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

15 <211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

0 <223> Primer

<400> 1

aaaaaactta agaaggagat atacatatga cattagaaat cttcgaa

47

25

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> Primer

<400> 2

35 aaaaaactgc agttagcgac ggctaataat at

32

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

45

<400> 3

aaaaaacata tgaagattgt cttagttctt

30

50

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

55

<220>

<223> Primer

<400> 4

aaaaaagacg tcttatttct tatcgtgttt ac

32

```
<210>    5  
      <211>   1120  
5     <212>   DNA  
      <213> Bacillus cereus  
  
      <220>  
      <221>   CDS  
10    <222> (20)..(1120)  
      <223>  
  
      <400>    5  
ttaaagaagga gatatacat atg aca tta gaa atc ttc gaa tac tta gaa aaa           52  
                               Met Thr Leu Glu Ile Phe Glu Tyr Leu Glu Lys  
                                1             5              10  
  
tat gat tat gag caa gta gta ttt tgt caa gat aaa gaa tct ggt tta           100  
Tyr Asp Tyr Glu Gln Val Val Phe Cys Gln Asp Lys Glu Ser Gly Leu  
                              15                20               25  
  
aaa gca att att gca att cat gat aca aca ctt gga ccg gct ctt ggt          148  
Lys Ala Ile Ile Ala Ile His Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly  
                             30                 35                  40  
  
gga aca aga atg tgg aca tat gat tct gaa gaa gcg gcg att gaa gat          196  
Gly Thr Arg Met Trp Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Ala Ala Ile Glu Asp  
                            45                   50                    55  
  
gca ttg cgt ctt gca aaa ggg atg aca tac aaa aac gca gca gct ggt          244  
Ala Leu Arg Leu Ala Lys Gly Met Thr Tyr Lys Asn Ala Ala Ala Gly  
        60                     65                       70                        75  
  
tta aac tta ggt ggt gcg aaa aca gta att atc ggt gat cct cgt aaa          292  
Leu Asn Leu Gly Gly Ala Lys Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys  
                                 80                      85                          90  
  
gat aag agc gaa gca atg ttc cgt gca cta gga cgt tat atc caa gga          340  
Asp Lys Ser Glu Ala Met Phe Arg Ala Leu Gly Arg Tyr Ile Gln Gly  
                           95                   100                    105  
  
cta aac gga cgt tac att aca gct gaa gat gtt ggt aca aca gta gat          388  
Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Val Asp  
                         110                      115                        120  
  
gat atg gat att atc cat gaa gaa act gac ttt gta aca ggt atc tca          436  
Asp Met Asp Ile Ile His Glu Glu Thr Asp Phe Val Thr Gly Ile Ser  
                        125                   130                    135  
  
cca tca ttc ggt tct tct ggt aac cca tct ccg gta act gca tac ggt          484  
Pro Ser Phe Gly Ser Ser Gly Asn Pro Ser Pro Val Thr Ala Tyr Gly  
       140                     145                       150                        155  
  
gtt tac cgt ggt atg aaa gca gct gca aaa gaa gct ttc ggt act gac          532  
Val Tyr Arg Gly Met Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Phe Gly Thr Asp  
                             160                   165                      170  
  
aat tta gaa gga aaa gta att gct gtt caa gcc gtt ggt aac gta gca          580  
Asn Leu Glu Gly Lys Val Ile Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala
```

	175	180	185	
5	tat cac cta tgc aaa cat tta cac gct gaa gga gca aaa tta att gtt Tyr His Leu Cys Lys His Leu His Ala Glu Gly Ala Lys Leu Ile Val 190 195 200			628
10	aca gat att aat aaa gaa gct gta caa cgt gct gta gaa gaa ttc ggt Thr Asp Ile Asn Lys Glu Ala Val Gln Arg Ala Val Glu Glu Phe Gly 205 210 215			676
15	gca tca gca gtt gaa cca aat gaa att tac ggt gtt gaa tgc gat att Ala Ser Ala Val Glu Pro Asn Glu Ile Tyr Gly Val Glu Cys Asp Ile 220 225 230 235			724
20	tac gca cca tgt gca cta ggc gca aca gtt aat gat gaa act att cca Tyr Ala Pro Cys Ala Leu Gly Ala Thr Val Asn Asp Glu Thr Ile Pro 240 245 250			772
25	caa ctt aaa gca aaa gta atc gca ggt tct gcg aat aac caa tta aaa Gln Leu Lys Ala Lys Val Ile Ala Gly Ser Ala Asn Asn Gln Leu Lys 255 260 265			820
30	gaa gat cgt cat ggt gac atc att cat gaa atg ggt att gta tac gca Glu Asp Arg His Gly Asp Ile Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala 270 275 280			868
35	cca gat tat gta att aat gca ggt ggc gta att aac gta gca gac gaa Pro Asp Tyr Val Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Asn Val Ala Asp Glu 285 290 295			916
40	tta tat gga tac aat aga gaa cgt gca cta aaa cgt gtt gag tct att Leu Tyr Gly Tyr Asn Arg Glu Arg Ala Leu Lys Arg Val Glu Ser Ile 300 305 310 315			964
45	tat gac acg att gca aaa gta atc gaa att tca aaa cgc gat ggc ata Tyr Asp Thr Ile Ala Lys Val Ile Glu Ile Ser Lys Arg Asp Gly Ile 320 325 330			1012
50	gca act tat gta gcg gca gat cgt cta gct gaa gag cgc att gca agc Ala Thr Tyr Val Ala Ala Asp Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ile Ala Ser 335 340 345			1060
55	ttg aag aat tct cgt agc act tac tta cgc aac ggt cac gat att att Leu Lys Asn Ser Arg Ser Thr Tyr Leu Arg Asn Gly His Asp Ile Ile 350 355 360			1108
60	agc cgt cgc taa Ser Arg Arg 365			1120
65	<210> 6 <211> 366 <212> PRT <213> Bacillus cereus <400> 6			

Met Thr Leu Glu Ile Phe Glu Tyr Leu Glu Lys Tyr Asp Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 5 Val Val Phe Cys Gln Asp Lys Glu Ser Gly Leu Lys Ala Ile Ile Ala
 20 25 30
 10 Ile His Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly Gly Thr Arg Met Trp
 35 40 45
 15 Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Ala Ala Ile Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ala
 50 55 60
 Lys Gly Met Thr Tyr Lys Asn Ala Ala Ala Gly Leu Asn Leu Gly Gly
 65 70 75 80
 0 Ala Lys Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys Asp Lys Ser Glu Ala
 85 90 95
 25 Met Phe Arg Ala Leu Gly Arg Tyr Ile Gln Gly Leu Asn Gly Arg Tyr
 100 105 110
 30 Ile Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Val Asp Asp Met Asp Ile Ile
 115 120 125
 35 His Glu Glu Thr Asp Phe Val Thr Gly Ile Ser Pro Ser Phe Gly Ser
 130 135 140
 Ser Gly Asn Pro Ser Pro Val Thr Ala Tyr Gly Val Tyr Arg Gly Met
 145 150 155 160
 0 Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Phe Gly Thr Asp Asn Leu Glu Gly Lys
 165 170 175
 45 Val Ile Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala Tyr His Leu Cys Lys
 180 185 190
 50 His Leu His Ala Glu Gly Ala Lys Leu Ile Val Thr Asp Ile Asn Lys
 195 200 205
 Glu Ala Val Gln Arg Ala Val Glu Glu Phe Gly Ala Ser Ala Val Glu
 210 215 220
 55 Pro Asn Glu Ile Tyr Gly Val Glu Cys Asp Ile Tyr Ala Pro Cys Ala
 225 230 235 240

Leu Gly Ala Thr Val Asn Asp Glu Thr Ile Pro Gln Leu Lys Ala Lys
 245 250 255

5 Val Ile Ala Gly Ser Ala Asn Asn Gln Leu Lys Glu Asp Arg His Gly
 260 265 270

10 Asp Ile Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Ile
 275 280 285

15 Asn Ala Gly Gly Val Ile Asn Val Ala Asp Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn
 290 295 300

0 Arg Glu Arg Ala Leu Lys Arg Val Glu Ser Ile Tyr Asp Thr Ile Ala
 305 310 315 320

Lys Val Ile Glu Ile Ser Lys Arg Asp Gly Ile Ala Thr Tyr Val Ala
 325 330 335

25 Ala Asp Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ile Ala Ser Leu Lys Asn Ser Arg
 340 345 350

30 Ser Thr Tyr Leu Arg Asn Gly His Asp Ile Ile Ser Arg Arg
 355 360 365

35 <210> 7
 <211> 1095
 <212> DNA
 <213> Candida boidinii

0 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1095)
 <223>

45 <400> 7
 atg aag att gtc tta gtt ctt tat gat gct ggt aag cac gct gct gat 48
 Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp
 1 5 10 15

50 gaa gaa aaa tta tat ggt tct act gaa aat aaa tta ggt att gct aat 96
 Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Ser Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn
 20 25 30

55 tgg tta aaa gat caa ggt cat gaa cta att act act tct gat aaa gaa 144
 Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Thr Ser Asp Lys Glu
 35 40 45

ggt gaa aca agt gaa ttg gat aaa cat atc cca gat gct gat att atc 192
 Gly Glu Thr Ser Glu Leu Asp Lys His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile
 50 55 60

	atc acc act cct ttc cat cct gct tat atc act aag gaa aga ctt gac	240
	Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp	
	65 70 75 80	
5	aag gct aag aac tta aaa tta gtc gtt gtc gct ggt gtt ggt tct gat	288
	Lys Ala Lys Asn Leu Lys Leu Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp	
	85 90 95	
10	cac att gat tta gat tat att aat caa aca ggt aag aaa atc tca gtc	336
	His Ile Asp Leu Asp Tyr Ile Asn Gln Thr Gly Lys Lys Ile Ser Val	
	100 105 110	
15	ctg gaa gtt aca ggt tct aat gtt gtc tct gtt gct gaa cac gtt gtc	384
	Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val	
	115 120 125	
20	atg acc atg ctt gtc ttg gtt aga aat ttc gtt cca gca cat gaa caa	432
	Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln	
	130 135 140	
25	att att aac cac gat tgg gag gtt gct gct atc gct aag gat gct tac	480
	Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr	
	145 150 155 160	
30	gat atc gaa ggt aaa act atc gct acc att ggt gct ggt aga att ggt	528
	Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly	
	165 170 175	
35	tac aga gtc ttg gaa aga tta ctc cca ttt aat cca aaa gaa tta tta	576
	Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Leu Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu	
	180 185 190	
40	tac tac gat tat caa gct tta cca aaa gaa gct gaa gaa aaa gtt ggt	624
	Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Glu Ala Glu Glu Lys Val Gly	
	195 200 205	
45	gct aga aga gtt gaa aat att gaa gaa tta gtt gct caa gct gat atc	672
	Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile	
	210 215 220	
50	gtt aca gtt aat gct cca tta cac gca ggt aca aaa ggt tta att aat	720
	Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn	
	225 230 235 240	
55	aag gaa tta tta tct aaa ttt aaa aaa ggt gct tgg tta gtc aat acc	768
	Lys Glu Leu Leu Ser Lys Phe Lys Lys Gly Ala Trp Leu Val Asn Thr	
	245 250 255	
60	gca aga ggt gct att gct gtt gct gaa gat gtt gca gca gct tta gaa	816
	Ala Arg Gly Ala Ile Ala Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Leu Glu	
	260 265 270	
65	tct ggt caa tta aga ggt tac ggt ggt gat gtt tgg ttc cca caa cca	864
	Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro	
	275 280 285	

gct cca aag gat cac cca tgg aga gat atg aga aat aaa tat ggt gct 912
 Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala
 290 295 300

5 ggt aat gcc atg act cct cac tac tct ggt act act tta gac gct caa 960
 Gly Asn Ala Met Thr Pro His Tyr Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ala Gln
 305 310 315 320

10 aca aga tac gct gaa ggt act aaa aat att ttg gaa tca ttc ttt acc 1008
 Thr Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Glu Ser Phe Phe Thr
 325 330 335

15 ggt aaa ttt gat tac aga cca caa gat att atc tta tta aat ggt gaa 1056
 Gly Lys Phe Asp Tyr Arg Pro Gln Asp Ile Ile Leu Leu Asn Gly Glu
 340 345 350

20 tac gtt act aaa gct tac ggt aaa cac gat aag aaa taa 1095
 Tyr Val Thr Lys Ala Tyr Gly Lys His Asp Lys Lys
 355 360

<210> 8
 <211> 364
 <212> PRT
 25 <213> Candida boidinii
 <400> 8

30 Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp
 1 5 10 15

35 Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Ser Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn
 20 25 30

Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Thr Ser Asp Lys Glu
 35 40 45

40 Gly Glu Thr Ser Glu Leu Asp Lys His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile
 50 55 60

45 Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp
 65 70 75 80

50 Lys Ala Lys Asn Leu Lys Leu Val Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp
 85 90 95

55 His Ile Asp Leu Asp Tyr Ile Asn Gln Thr Gly Lys Lys Ile Ser Val
 100 105 110

Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val
 115 120 125

Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln
 130 135 140

5

Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr
 145 150 155 160

10

Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly
 165 170 175

15

Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Leu Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu
 180 185 190

20

Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Glu Ala Glu Glu Lys Val Gly
 195 200 205

25

Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile
 210 215 220

Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn
 225 230 235 240

30

Lys Glu Leu Leu Ser Lys Phe Lys Lys Gly Ala Trp Leu Val Asn Thr
 245 250 255

35

Ala Arg Gly Ala Ile Ala Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

40

Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro
 275 280 285

45

Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala
 290 295 300

Gly Asn Ala Met Thr Pro His Tyr Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ala Gln
 305 310 315 320

50

Thr Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Glu Ser Phe Phe Thr
 325 330 335

55

Gly Lys Phe Asp Tyr Arg Pro Gln Asp Ile Ile Leu Leu Asn Gly Glu
 340 345 350

Tyr Val Thr Lys Ala Tyr Gly Lys His Asp Lys Lys
 355 360

5 <210> 9
 <211> 5686
 <212> DNA
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Plasmid pAM3.25

15 <400> 9
 tatgaagatt gtcttagttc tttatgatgc tggtaagcac gctgctgatg aagaaaaatt 60
 atatggttct actgaaaata aattaggtat tgctaattgg ttaaaagatc aagggtcatga 120
 actaattact acttctgata aagaaggtga aacaagtga ttggataaac atatcccaga 180
 tgctgatatt atcatcacca ctcttttcca tcctgcttat atcactaagg aaagacttga 240
 caaggctaag aacttaaaat tagtcgttgt cgctgggtgtt ggttctgatc acattgattt 300
 agattatatt aatcaaacag gtaagaaaat ctcatgcttg gaagttacag gttctaattgt 360
 tgtctctgtt gctgaacacg ttgtcatgac catgcttgct ttggttagaa atttcgttcc 420
 25 agcacatgaa caaattatta accacgattg ggaggttgct gctatcgcta aggatgctta 480
 cgatatcgaa ggtaaaacta tcgctacat tggtgctggt agaattgggt acagagtctt 540
 30 ggaaagatta ctccatttta atccaaaaga attattatac tacgattatc aagctttacc 600
 aaaagaagct gaagaaaaag ttggtgctag aagagttgaa aatattgaag aattagttgc 660
 tcaagctgat atcgttacag ttaatgctcc attacacgca ggtacaaaag gtttaattaa 720
 35 taaggaatta ttatctaaat ttaaaaaagg tgcttggtta gtcaataaccg caagagggtgc 780
 tattgctgtt gctgaagatg ttgcagcagc tttagaatct ggtcaattaa gaggttacgg 840
 40 ttggtgatgtt tgggtccac aaccagctcc aaaggatcac ccatggagag atatgagaaa 900
 taaatatggt gctggtaatg ccatgaactc tcactactct ggtactactt tagacgctca 960
 aacaagatac gctgaaggta ctaaaaatat tttggaatca ttctttaccg gtaaatttga 1020
 45 ttacagacca caagatatta tcttattaaa tgggtgaatac gttactaaag cttacggtaa 1080
 acacgataag aaataagacg tcaagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag 1140
 50 cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggctctgata aaacagaatt tgccctggcgg 1200
 cagtagcgcg gtgggtccac ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc 1260
 cgatggtagt gtgggggtctc cccatgagag agtagggaac tgccaggcat caaataaaac 1320
 55 gaaaggctca gtcgaaagac tgggccttct gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc 1380
 tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcaagcaa cggcccggag 1440

	ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc	1500
	tgacggatgg ccttttttgcg tttctacaaa ctcttttggtt tattttttcta aatacattca	1560
5	aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg	1620
	aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc	1680
	cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg	1740
10	ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt	1800
	cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaag ttctgctatg tggcgcggtta	1860
15	ttatcccggtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat	1920
	gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga	1980
	gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca	2040
	acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact	2100
	cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc	2160
25	acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact	2220
	ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt	2280
	ctgcgctcgg cccttcgggc tggctgggtt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt	2340
30	gggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt	2400
	atctacacga cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata	2460
35	ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag	2520
	attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat	2580
	ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa	2640
	aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca	2700
	aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt	2760
45	ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgagc ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg	2820
	tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaata	2880
	ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga	2940
50	cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc	3000
	agcttgagagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc	3060
55	gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca	3120
	ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg	3180
	tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta	3240

	tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct	3300
	cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag	3360
5	tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa	3420
	gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcata tgtgcggtat ttcacaccgc	3480
10	atatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagtatacac	3540
	tccgctatcg ctacgtgact gggtcattggc tgcgccccga caccgcgcaa caccgcgtga	3600
	cgcgcccctga cgggcttgct tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc	3660
15	cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcatacccg aaacgcgcga ggcagctgcg	3720
	gtaaagctca tcagcgtggt cgtgaagcga ttcacagatg tctgcctggt catccgcgtc	3780
20	cagctcgttg agttttctca gaagcgttaa tgtctggctt ctgataaagc gggccatggt	3840
	aagggcggtt ttttctggtt tggctacttg atgcctccgt gtaaggggga atttctgttc	3900
	atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat	3960
25	gaacatgccc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg	4020
	gaccagagaa aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtggt	4080
30	ccacagggta gccagcagca tctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct	4140
	gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tggtgttgct	4200
	caggctgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca	4260
35	ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg tccccaacga caggagcacg	4320
	atcatgcgca cccgtggcca ggaccaacg ctgcccgaga tgcgcgcgt gcggctgctg	4380
40	gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg tttgcgcatt cacagttctc	4440
	cgcaagaatt gattggctcc aattcttggg gtggtgaatc cgttagcgag gtgccgcgg	4500
	cttccattca ggtcgaggtg gcccggtcc atgcaccgcg acgcaacgcg gggaggcaga	4560
45	caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccggtt ccatgtgctc gccgaggcgg	4620
	cataaatcgc cgtgacgatc agcgggtccag tgatcgaagt taggctggta agagccgcga	4680
50	gcgatccttg aagctgtccc tgatggctcg catctacctg cctggacagc atggcctgca	4740
	acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat aatggggaag gccatccagc	4800
	ctcgcgtcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc ggccgccatg ccggcgataa	4860
55	tggcctgctt ctcgccgaaa cgtttggtgg cgggaccagt gacgaaggct tgagcgaggg	4920
	cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat cgtcgcgctc cagcgaaagc	4980

ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgctg ccggcacctg tcttacgagt tgcatagataa 5040
 agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctga 5100
 5 ctggggttgaa ggctctcaag ggcatcgggtc gacgctctcc cttatgcgac tcttgcatta 5160
 ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc cgccgcaagg aatgggtgcat 5220
 10 gctcgatggc tacgagggca gacagtaagt ggatttacca taatccctta attgtacgca 5280
 ccgctaaaac gcgttcagcg cgatcacggc agcagacagg taaaaatggc aacaaaccac 5340
 cctaaaaact gcgcgatcgc gcctgataaa ttttaaccgt atgaatacct atgcaaccag 5400
 15 aggggtacagg ccacattacc cccacttaat cactgaagc tgccattttt catgggtttca 5460
 ccatcccagc gaagggccat gcatgcatcg aaattaatac gacgaaatta atacgactca 5520
 ctatagggca attgcgatca ccacaattca gcaaattgtg aacatcatca cgttcatctt 5580
 tccctgggtg ccaatggccc attttctgt cagtaacgag aaggctcgca attcaggcgc 5640
 tttttagact ggtcgtaatg aacaattctt aagaaggaga tataca 5686
 25
 <210> 10
 <211> 5106
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Plasmid pAM10.1
 <400> 10
 35 gaaggagata tacatatgac attagaaatc ttccaatact tagaaaaata tgattatgag 60
 caagtagtat tttgtcaaga taaagaatct ggtttaaaag caattattgc aattcatgat 120
 acaacacttg gaccggctct tgggtggaaca agaattgtga catatgattc tgaagaagcg 180
 gcgattgaag atgcattgcg tcttgcaaaa gggatgacat aaaaaaacgc agcagctggt 240
 ttaaacttag gtggtgcgaa aacagtaatt atcggtgatc ctcgtaaaga taagagcgaa 300
 45 gcaatgttcc gtgcactagg acgttatatc caaggactaa acggacgtta cattacagct 360
 gaagatgttg gtacaacagt agatgatatg gatattatcc atgaagaaac tgactttgta 420
 acaggtatct caccatcatt cggttcttct ggtaaccocat ctccggtaac tgcatacggc 480
 50 gtttaccgtg gtatgaaagc agctgcaaaa gaagctttcg gtactgacaa tttagaagga 540
 aaagtaattg ctgttcaagg cgttggtaac gtagcatatc acctatgcaa acatttacac 600
 55 gctgaaggag caaaattaat tggtacagat attaataaag aagctgtaca acgtgctgta 660
 gaagaattcg gtgcacagc agttgaacca aatgaaattt acggtgttga atgcgatatt 720
 tacgcaccat gtgcactagg cgcaacagtt aatgatgaaa ctattccaca acttaaagca 780

	aaagtaatcg caggttctgc gaataaccaa ttaaaagaag atogtcatgg tgacatcatt	840
	catgaaatgg gtattgtata cgcaccagat tatgtaatta atgcaggtgg cgtaattaac	900
5	gtagcagacg aattatatgg atacaataga gaacgtgcac taaaacgtgt tgagtctatt	960
	tatgacacga ttgcaaaagt aatcgaaatt tcaaaacgcg atggcatagc aacttatgta	1020
10	gcggcagatc gtctagctga agagcgcatt gcaagcttga agaattctcg tagcacttac	1080
	ttacgcaacg gtcacgatat tattagocgt cgctaacgcg tttgcggttg gcaaaatggc	1140
15	gcagcagcaa ggcgtggcgg tgaaaacctc tgccgaagcc ctgcaacagg ccattgacga	1200
	taatttcttg caagccgaat accgcgacta ccgcgcgtacc tccatctaaa agcttatcga	1260
	tgataagctg tcaaacatga gaattacaac ttatatcgta tggggctgac ttcaggtgct	1320
20	acatttgaag agataaattg cactgaaatc tagaaatatt ttatctgatt aataagatga	1380
	tcttcttgag atcgttttgg tctgcgcgta atctcttgc ctgaaaacga aaaaaccgcc	1440
25	ttgcagggcg gtttttcgaa ggttctctga gctaccaact ctttgaaccg aggtaactgg	1500
	cttggaggag cgcagtcacc aaaacttgtc ctttcagttt agccttaacc ggcgcatgac	1560
	ttcaagacta actcctctaa atcaattacc agtggctgct gccagtgggtg cttttgcatg	1620
30	tctttccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cggactgaac	1680
	gggggggttcg tgcatacagt ccagcttggg gcgaactgcc taccgggaac tgagtgtcag	1740
35	gcgtggaatg agacaaaacgc ggccataaca gcggaatgac accggtaaac cgaaaggcag	1800
	gaacaggaga gcgcacgagg gagccgccag gggaaaacgcc tggatatctt atagtctgt	1860
	cgggtttcgc caccactgat ttgagcgtca gatttctgtga tgcttgtcag gggggcggag	1920
40	cctatgga aaacggctttg ccgcggccct ctcaactccc tgttaagtat cttcctggca	1980
	tcttccagga aatctccgcc ccgttcgtaa gccatttccg ctgcgccgag tccaacgacc	2040
45	gagcgtagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaatatatcc tgtatcacat attctgtga	2100
	cgcaccggtg cagccttttt tctcctgcc catgaagcac ttcactgaca cctcatcag	2160
	tgccaacata gtaagccagt atacactccg ctagcgtga tgtccggcgg tgcctttgcc	2220
50	gttacgcacc acccgcgcag tagctgaaca ggaggacag ctgatagaaa cagaagccac	2280
	tggagcacct caaaaacacc atcatcact aaatcagtaa gttggcagca tccccgacg	2340
55	cactttgcgc cgaataaata cctgtgacgg aagatcactt cgcagaataa ataaatcctg	2400
	gtgtccctgt tgataccggg aagccctggg ccaacttttg gcgaaaatga gacgttgatc	2460
	ggcacgtaag aggttccaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg ggcgtatttt	2520

	ttgagttatc gagattttca ggagctaagg aagctaaaat ggagaaaaaa atcactggat	2580
	ataccaccgt tgatatatcc caatggcatc gtaaagaaca ttttgaggca tttcagtcag	2640
5	ttgctcaatg tacctataac cagaccgttc agctggatat tacggccttt ttaaagaccg	2700
	taaagaaaaa taagcacaag ttttatccgg cctttattca cattcttgcc cgctgatga	2760
	atgctcatcc ggaattccgt atggcaatga aagacggtga gctggtgata tgggatagt	2820
10	ttcacccttg ttacaccgtt ttccatgagc aaactgaaac gttttcatcg ctctggagt	2880
	aataccacga cgatttccgg cagtttctac acatatattc gcaagatgtg gcgtgttacg	2940
15	gtgaaaacct ggctatttc cctaaagggg ttattgagaa tatgtttttc gtctcagcca	3000
	atccctgggt gagtttcacc agttttgatt taaacgtggc caatatggac aacttcttcg	3060
	ccccgtttt caccatgggc aatatattata cgcaaggcga caaggtgctg atgccgctgg	3120
0	cgattcaggt tcatcatgcc gtctgtgatg gcttccatgt cggcagaatg cttaatgaat	3180
	tacaacagta ctgcgatgag tggcagggcg gggcgtaatt tttttaaggc agttattggt	3240
25	gcccttaaac gcctggtgct acgcctgaat aagtataat aagcggatga atggcagaaa	3300
	ttcgaaagca aattcgaccc ggtcgtcggt tcagggcagg gtcgttaaat agccgcttat	3360
	gtctattgct ggtttaccgg tttattgact accggaagca gtgtgaccgt gtgcttctca	3420
30	aatgcctgag gccagtttgc tcaggetctc cccgtggagg taataattga cgatatgatc	3480
	atttattctg cctcccagag cctgataaaa acggttagcg ctctgttaat acagatgtag	3540
35	gtgttccaca gggtagccag cagcatcctg cgatgcagat ccggaacata atggtgcagg	3600
	gcgcttggtt cggcggtgggt atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgctg	3660
	ccggcacctg tcctacgagt tgcataataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag	3720
40	tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctac cggacagcgg tgcggactgt tgtaactcag	3780
	aataagaaat gaggccgctc atggcggtga ctctcagtc tagtatcgtg gtatcaccgg	3840
45	ttggttccac tctctgttgc gggcaacttc agcagcacgt aggggacttc cgcgtttcca	3900
	gactttacga aacacggaaa ccgaagacca ttcatgttgt tgctcaggtc gcagacgttt	3960
	tgcagcagca gtcgcttcac gtctgctcgc gtatcggatga ttcattctgc taaccagtaa	4020
50	ggcaaccccc ccagcctagc cgggtcctca acgacaggag cacgatcatg cgcaccctg	4080
	gccaggaccc aacgctgccc gagatgcgcc gcgtgcggct gctggagatg gcggacgcga	4140
55	tggatatgtt ctgccaaggg ttggtttgcg cattcacagt tctccgcaag aattgattgg	4200
	ctccaattct tggagtgggt aatccgttag cgaggtgcgc cgggcttcca ttcaggtcga	4260
	ggtggccccg ctccatgcac cgcgacgcaa cgcggggagg cagacaaggt atagggcggc	4320

```

gcctacaatc catgccaacc cgttccatgt gctcgccgag gcggcataaa tcgccgtgac 4380
5 gatcagcggg cagtgatcg aagttaggct ggtaagagcc gcgagcgatc cttgaagctg 4440
tccctgatgg tcgtcatcta cctgcctgga cagcatggcc tgcaacgcgg gcaccccgat 4500
gccgccgga gcgagaagaa tcataatggg gaaggccatc cagcctcgcg tcgcgaacgc 4560
10 cagcaagacg tagcccagcg cgtcgggccg catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc 4620
gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa 4680
taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat 4740
15 gaccagagc gctgccggca cctgtcctac gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag 4800
tgccgagcg atagtcatgc cccgcgccc cgggaaggag ctgactgggt tgaaggctct 4860
caagggcatc ggtcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag 4920
taggttgagg ccgttgagca ccgccgccg aaggaatggg gcatgcatcg atcaccacaa 4980
25 ttcagcaa at tgtgaacatc atcacgttca tctttccctg gttgccaatg gccattttc 5040
ctgtcagtaa cgagaaggtc gcgaattcag gcgcttttta gactggtcgt aatgaacaat 5100
tcttaa 5106

30 <210> 11
    <211> 5597
    <212> DNA
    <213> Unknown
35 <220>
    <223> Plasmid

40 <220>
    <221> CDS
    <222> (25)..(1749)
    <223> scfA - malic enzyme gene

45 <400> 11
aattcttaag aaggagatat acat atg gat att caa aaa aga gtg agt gac 51
                               Met Asp Ile Gln Lys Arg Val Ser Asp
                               1           5

50 atg gaa cca aaa aca aaa aaa cag cgt tcg ctt tat atc cct tac gct 99
Met Glu Pro Lys Thr Lys Lys Gln Arg Ser Leu Tyr Ile Pro Tyr Ala
10           15           20           25

55 ggc cct gta ctg ctg gaa ttt ccg ttg ttg aat aaa ggc agt gcc ttc 147
Gly Pro Val Leu Leu Glu Phe Pro Leu Leu Asn Lys Gly Ser Ala Phe
30           35           40

```

	agc atg gaa gaa cgc cgt aac ttc aac ctg ctg ggg tta ctg ccg gaa	195
	Ser Met Glu Glu Arg Arg Asn Phe Asn Leu Leu Gly Leu Leu Pro Glu	
	45 50 55	
5	gtg gtc gaa acc atc gaa gaa caa gcg gaa cga gca tgg atc cag tat	243
	Val Val Glu Thr Ile Glu Glu Gln Ala Glu Arg Ala Trp Ile Gln Tyr	
	60 65 70	
10	cag gga ttc aaa acc gaa atc gac aaa cac atc tac ctg cgt aac atc	291
	Gln Gly Phe Lys Thr Glu Ile Asp Lys His Ile Tyr Leu Arg Asn Ile	
	75 80 85	
15	cag gac act aac gaa acc ctc ttc tac cgt ctg gta aac aat cat ctt	339
	Gln Asp Thr Asn Glu Thr Leu Phe Tyr Arg Leu Val Asn Asn His Leu	
	90 95 100 105	
	gat gag atg atg cct gtt att tat acc cca acc gtc ggc gca gcc tgt	387
	Asp Glu Met Met Pro Val Ile Tyr Thr Pro Thr Val Gly Ala Ala Cys	
	110 115 120	
	gag cgt ttt tct gag atc tac cgc cgt tca cgc ggc gtg ttt atc tct	435
	Glu Arg Phe Ser Glu Ile Tyr Arg Arg Ser Arg Gly Val Phe Ile Ser	
	125 130 135	
25	tac cag aac cgg cac aat atg gac gat att ctg caa aac gtg ccg aac	483
	Tyr Gln Asn Arg His Asn Met Asp Asp Ile Leu Gln Asn Val Pro Asn	
	140 145 150	
30	cat aat att aaa gtg att gtg gtg act gac ggt gaa cgc att ctg ggg	531
	His Asn Ile Lys Val Ile Val Val Thr Asp Gly Glu Arg Ile Leu Gly	
	155 160 165	
35	ctt ggt gac cag ggc atc ggc ggg atg ggc att ccg atc ggt aaa ctg	579
	Leu Gly Asp Gln Gly Ile Gly Gly Met Gly Ile Pro Ile Gly Lys Leu	
	170 175 180 185	
	tcg ctc tat acc gcc tgt ggc ggc atc agc ccg gcg tat acc ctt ccg	627
	Ser Leu Tyr Thr Ala Cys Gly Gly Ile Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Pro	
	190 195 200	
	gtg gtg ctg gat gtc gga acg aac aac caa cag ctg ctt aac gat ccg	675
	Val Val Leu Asp Val Gly Thr Asn Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Pro	
	205 210 215	
45	ctg tat atg ggc tgg cgt aat ccg cgt atc act gac gac gaa tac tat	723
	Leu Tyr Met Gly Trp Arg Asn Pro Arg Ile Thr Asp Asp Glu Tyr Tyr	
	220 225 230	
50	gaa ttc gtt gat gaa ttt atc cag gct gtg aaa caa cgc tgg cca gac	771
	Glu Phe Val Asp Glu Phe Ile Gln Ala Val Lys Gln Arg Trp Pro Asp	
	235 240 245	
55	gtg ctg ttg cag ttt gaa gac ttt gct caa aaa aat gcg atg ccg tta	819
	Val Leu Leu Gln Phe Glu Asp Phe Ala Gln Lys Asn Ala Met Pro Leu	
	250 255 260 265	
	ctt aac cgc tat cgc aat gaa att tgt tct ttt aac gat gac att cag	867
	Leu Asn Arg Tyr Arg Asn Glu Ile Cys Ser Phe Asn Asp Asp Ile Gln	
	270 275 280	

	ggc act gcg gcg gta aca gtc ggc aca ctg atc gca gca agc cgc gcg	915
	Gly Thr Ala Ala Val Thr Val Gly Thr Leu Ile Ala Ala Ser Arg Ala	
	285 290 295	
5	gca ggt ggt cag tta agc gag aaa aaa atc gtc ttc ctt ggc gca ggt	963
	Ala Gly Gly Gln Leu Ser Glu Lys Lys Ile Val Phe Leu Gly Ala Gly	
	300 305 310	
10	tca gcg gga tgc ggc att gcc gaa atg atc atc tcc cag acc cag cgc	1011
	Ser Ala Gly Cys Gly Ile Ala Glu Met Ile Ile Ser Gln Thr Gln Arg	
	315 320 325	
15	gaa gga tta agc gag gaa gcg gcg cgg cag aaa gtc ttt atg gtc gat	1059
	Glu Gly Leu Ser Glu Ala Ala Arg Gln Lys Val Phe Met Val Asp	
	330 335 340 345	
20	cgc ttt ggc ttg ctg act gac aag atg ccg aac ctg ctg cct ttc cag	1107
	Arg Phe Gly Leu Leu Thr Asp Lys Met Pro Asn Leu Leu Pro Phe Gln	
	350 355 360	
25	acc aaa ctg gtg cag aag cgc gaa aac ctc agt gac tgg gat acc gac	1155
	Thr Lys Leu Val Gln Lys Arg Glu Asn Leu Ser Asp Trp Asp Thr Asp	
	365 370 375	
30	agc gat gtg ctg tca ctg ctg gat gtg gtg cgc aat gta aaa cca gat	1203
	Ser Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Val Val Arg Asn Val Lys Pro Asp	
	380 385 390	
35	att ctg att ggc gtc tca gga cag acc ggg ctg ttt acg gaa gag atc	1251
	Ile Leu Ile Gly Val Ser Gly Gln Thr Gly Leu Phe Thr Glu Glu Ile	
	395 400 405	
40	atc cgt gag atg cat aaa cac tgt ccg cgt ccg atc gtg atg ccg ctg	1299
	Ile Arg Glu Met His Lys His Cys Pro Arg Pro Ile Val Met Pro Leu	
	410 415 420 425	
45	tct aac ccg acg tca cgc gtg gaa gcc aca ccg cag gac att atc gcc	1347
	Ser Asn Pro Thr Ser Arg Val Glu Ala Thr Pro Gln Asp Ile Ile Ala	
	430 435 440	
50	tgg acc gaa ggt aac gcg ctg gtc gcc acg ggc agc ccg ttt aat cca	1395
	Trp Thr Glu Gly Asn Ala Leu Val Ala Thr Gly Ser Pro Phe Asn Pro	
	445 450 455	
55	gtg gta tgg aaa gat aaa atc tac cct atc gcc cag tgt aac aac gcc	1443
	Val Val Trp Lys Asp Lys Ile Tyr Pro Ile Ala Gln Cys Asn Asn Ala	
	460 465 470	
60	ttt att ttc ccg ggc atc ggc ctg ggt gtt att gct tcc ggc gcg tca	1491
	Phe Ile Phe Pro Gly Ile Gly Leu Gly Val Ile Ala Ser Gly Ala Ser	
	475 480 485	
65	cgt atc acc gat gag atg ctg atg tcg gca agt gaa acg ctg gcg cag	1539
	Arg Ile Thr Asp Glu Met Leu Met Ser Ala Ser Glu Thr Leu Ala Gln	
	490 495 500 505	

	tat tca cca ttg gtg ctg aac ggc gaa ggt atg gta ctg ccg gaa ctg	1587
	Tyr Ser Pro Leu Val Leu Asn Gly Glu Gly Met Val Leu Pro Glu Leu	
	510 515 520	
5	aaa gat att cag aaa gtc tcc cgc gca att gcg ttt gcg gtt ggc aaa	1635
	Lys Asp Ile Gln Lys Val Ser Arg Ala Ile Ala Phe Ala Val Gly Lys	
	525 530 535	
10	atg gcg cag cag caa ggc gtg gcg gtg aaa acc tct gcc gaa gcc ctg	1683
	Met Ala Gln Gln Gln Gly Val Ala Val Lys Thr Ser Ala Glu Ala Leu	
	540 545 550	
15	caa cag gcc att gac gat aat ttc tgg caa gcc gaa tac cgc gac tac	1731
	Gln Gln Ala Ile Asp Asp Asn Phe Trp Gln Ala Glu Tyr Arg Asp Tyr	
	555 560 565	
	cgc cgt acc tcc atc taa aagcttatcg atgataagct gtcaaacatg	1779
	Arg Arg Thr Ser Ile	
	570	
20	agaattacaa cttatatcgt atggggctga cttcaggtgc tacatttgaa gagataaatt	1839
	gcactgaaat ctagaaatat tttatctgat taataagatg atcttcttga gatcgttttg	1899
25	gtctgcgcgt aatctcttgc tctgaaaacg aaaaaaccgc cttgcagggc ggtttttcga	1959
	aggttctctg agctaccaac tctttgaacc gaggttaactg gcttggagga gcgcagtcac	2019
30	caaaaacttgt cttttcagtt tagccttaac cggcgcatga cttcaagact aactcctcta	2079
	aatcaattac cagtggctgc tgccagtggg gcttttgcac gtctttccgg gttggactca	2139
	agacgatagt taccggataa ggcgagcgg tccgactgaa cgggggggttc gtgcatacag	2199
35	tccagcttgg agcgaactgc ctaccggaa ctgagtgtca ggcgtggaat gagacaaacg	2259
	cggccataac agcggaatga caccggtaaa ccgaaaggca ggaacaggag agcgcacgag	2319
40	ggagccgcca ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcttg tcgggtttcg ccaccactga	2379
	tttgagcgtc agatttcgtg atgcttgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacggcttt	2439
	gccgcggccc tctcacttcc ctgttaagta tcttctggc atcttccagg aaatctccgc	2499
45	cccgttcgta agccatttcc gctgcgcgca gtcgaacgac cgagcgtagc gagtcagtga	2559
	gcgaggaagc ggaatatatc ctgtatcaca tattctgctg acgcaccggg gcagcctttt	2619
50	ttctcctgcc acatgaagca cttcactgac accctcatca gtgccaacat agtaagccag	2679
	tatacactcc gctagcgctg atgtccggcg gtgcttttgc cgttacgcac caccctgtca	2739
	gtagctgaac aggaggggaca gctgatagaa acagaagcca ctggagcacc tcaaaaacac	2799
55	catcatacac taaatcagta agttggcagc atcaccgcgac gcacttttgc ccgaataaat	2859
	acctgtgacg gaagatcact tcgcagaata aataaatcct ggtgtccctg ttgataccgg	2919
	gaagccctgg gccaaactttt ggcgaaaatg agacgttgat cggcacgtaa gaggttccaa	2979

	ctttcaccat aatgaaataa gatcactacc gggcgtat	3039
	aggagctaag gaagctaaaa tggagaaaaa aatcactgga tataccaccg ttgatata	3099
5	ccaatggcat cgtaaagaac attttgaggc atttcagtca gttgctcaat gtacctataa	3159
	ccagaccgtt cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacia	3219
10	gttttatccg gcctttattc acattcttgc ccgcctgatg aatgctcatc cggaattccg	3279
	tatggcaatg aaagacggtg agctgggatg atgggatagt gttcaccctt gttacaccgt	3339
	tttccatgag caaactgaaa cgttttctatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg	3399
15	gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctat	3459
	ccctaaaggg tttattgaga atatgtttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcac	3519
20	cagttttgat ttaaactgtg ccaatatgga caacttcttc gccccggtt tcaccatggg	3579
	caaataattat acgcaaggcg acaaggtgct gatgccgctg gcgattcagg ttcacatgc	3639
	cgtctgtgat ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga	3699
25	gtggcagggc ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgcccttaaa cgctggtgc	3759
	tacgcctgaa taagtataa taagcggatg aatggcagaa attcgaaagc aaattcgacc	3819
30	cggtcgtcgg ttcagggcag ggtcgtaaa tagccgctta tgtctattgc tggtttaccg	3879
	gtttattgac taccggaagc agtgtgaccg tgtgcttctc aaatgcctga ggccagtttg	3939
	ctcaggctct ccccggtggag gtaataattg acgatatgat catttattct gcctcccaga	3999
35	gcctgataaa aacggtttagc gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca	4059
	gcagcatcct gcgatgcaga tccggaacat aatgggtgcag ggcgcttggt tcggcgtggg	4119
40	tatgggtggca ggcctcggtg ccgggggact gttgggcgct gccggcacct gtcctacgag	4179
	ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata gtcatgcccc gcgcccaccg	4239
	gaaggagcta ccggacagcg gtgcggactg ttgtaactca gaataagaaa tgaggccgct	4299
45	catggcggtg actctcagtc atagtatcgt ggtatcaccg gttgggtcca ctctctgttg	4359
	cgggcaactt cagcagcacg taggggactt ccgcgtttcc agactttacg aaacacggaa	4419
50	accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacggt ttgcagcagc agtcgcttca	4479
	cgttcgtctg cgtatcgggtg attcattctg ctaaccagta aggcaacccc gccagcctag	4539
	ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt ggccaggacc caacgctgcc	4599
55	cgagatgcgc cgcgtgcggc tgctggagat ggcggacgcg atggatatgt tctgccaaagg	4659
	gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg gtcctaattc ttggagtgg	4719

gaatccgtta gcgaggtgcc gccggcttcc attcaggtcg aggtggcccg gctccatgca 4779
 ccgcgacgca acgcgggggag gcagacaagg tatagggcgg cgctacaat ccatgccaac 4839
 5 ccgttccatg tgctcgccga ggcggcataa atcgccgtga cgatcagcgg tccagtgatc 4899
 gaagttaggc tggtaagagc cgcgagcgat ccttgaaget gtccctgatg gtctcatct 4959
 10 acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcatcccga tgccgcccga agcgagaaga 5019
 atcataatgg ggaagggccat ccagcctcgc gtgcggaacg ccagcaagac gtagcccagc 5079
 gcgtcggccg ccatgccggc gataatggcc tgcttctcgc cgaaacgttt ggtggcggga 5139
 15 ccagtgcga aggcttgagc gagggcgtgc aagattccga ataccgcaag cgacaggccg 5199
 atcatcgctc cgctccagcg aaagcgggtcc tcgccgaaaa tgaccagag cgctgccggc 5259
 acctgtccta cgagttgcat gataaagaag acagtcataa gtgcggcgac gatagtcattg 5319
 ccccgcgccc accggaagga gctgactggg ttgaaggctc tcaagggcat cggtcgacgc 5379
 tctcccttat gcgactcctg cattaggaag cagcccagta gtaggttgag gccgttgagc 5439
 25 accgcccgcg caaggaatgg tgcattgcac gatcaccaca attcagcaaa ttgtgaacat 5499
 catcacgttc atctttccct ggttgccaat ggccattttt cctgtcagta acgagaaggt 5559
 30 cgcgaattca ggcgcttttt agactggctg taatgaac 5597

<210> 12
 <211> 574
 <212> PRT
 35 <213> Unknown

<220>
 <223> Plasmid

0 <400> 12

Met Asp Ile Gln Lys Arg Val Ser Asp Met Glu Pro Lys Thr Lys Lys
 1 5 10 15

45 Gln Arg Ser Leu Tyr Ile Pro Tyr Ala Gly Pro Val Leu Leu Glu Phe
 20 25 30

50 Pro Leu Leu Asn Lys Gly Ser Ala Phe Ser Met Glu Glu Arg Arg Asn
 35 40 45

55 Phe Asn Leu Leu Gly Leu Leu Pro Glu Val Val Glu Thr Ile Glu Glu
 50 55 60

Gln Ala Glu Arg Ala Trp Ile Gln Tyr Gln Gly Phe Lys Thr Glu Ile
 65 70 75 80

5 Asp Lys His Ile Tyr Leu Arg Asn Ile Gln Asp Thr Asn Glu Thr Leu
 85 90 95
 Phe Tyr Arg Leu Val Asn Asn His Leu Asp Glu Met Met Pro Val Ile
 100 105 110
 10 Tyr Thr Pro Thr Val Gly Ala Ala Cys Glu Arg Phe Ser Glu Ile Tyr
 115 120 125
 15 Arg Arg Ser Arg Gly Val Phe Ile Ser Tyr Gln Asn Arg His Asn Met
 130 135 140
 20 Asp Asp Ile Leu Gln Asn Val Pro Asn His Asn Ile Lys Val Ile Val
 145 150 155 160
 Val Thr Asp Gly Glu Arg Ile Leu Gly Leu Gly Asp Gln Gly Ile Gly
 165 170 175
 25 Gly Met Gly Ile Pro Ile Gly Lys Leu Ser Leu Tyr Thr Ala Cys Gly
 180 185 190
 30 Gly Ile Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Pro Val Val Leu Asp Val Gly Thr
 195 200 205
 35 Asn Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Pro Leu Tyr Met Gly Trp Arg Asn
 210 215 220
 40 Pro Arg Ile Thr Asp Asp Glu Tyr Tyr Glu Phe Val Asp Glu Phe Ile
 225 230 235 240
 Gln Ala Val Lys Gln Arg Trp Pro Asp Val Leu Leu Gln Phe Glu Asp
 245 250 255
 45 Phe Ala Gln Lys Asn Ala Met Pro Leu Leu Asn Arg Tyr Arg Asn Glu
 260 265 270
 50 Ile Cys Ser Phe Asn Asp Asp Ile Gln Gly Thr Ala Ala Val Thr Val
 275 280 285
 55 Gly Thr Leu Ile Ala Ala Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gln Leu Ser Glu
 290 295 300

Lys Lys Ile Val Phe Leu Gly Ala Gly Ser Ala Gly Cys Gly Ile Ala
 305 310 315 320

5 Glu Met Ile Ile Ser Gln Thr Gln Arg Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala
 325 330 335

10 Ala Arg Gln Lys Val Phe Met Val Asp Arg Phe Gly Leu Leu Thr Asp
 340 345 350

15 Lys Met Pro Asn Leu Leu Pro Phe Gln Thr Lys Leu Val Gln Lys Arg
 355 360 365

Glu Asn Leu Ser Asp Trp Asp Thr Asp Ser Asp Val Leu Ser Leu Leu
 370 375 380

Asp Val Val Arg Asn Val Lys Pro Asp Ile Leu Ile Gly Val Ser Gly
 385 390 395 400

25 Gln Thr Gly Leu Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Glu Met His Lys His
 405 410 415

30 Cys Pro Arg Pro Ile Val Met Pro Leu Ser Asn Pro Thr Ser Arg Val
 420 425 430

35 Glu Ala Thr Pro Gln Asp Ile Ile Ala Trp Thr Glu Gly Asn Ala Leu
 435 440 445

Val Ala Thr Gly Ser Pro Phe Asn Pro Val Val Trp Lys Asp Lys Ile
 450 455 460

Tyr Pro Ile Ala Gln Cys Asn Asn Ala Phe Ile Phe Pro Gly Ile Gly
 465 470 475 480

45 Leu Gly Val Ile Ala Ser Gly Ala Ser Arg Ile Thr Asp Glu Met Leu
 485 490 495

50 Met Ser Ala Ser Glu Thr Leu Ala Gln Tyr Ser Pro Leu Val Leu Asn
 500 505 510

Gly Glu Gly Met Val Leu Pro Glu Leu Lys Asp Ile Gln Lys Val Ser
 515 520 525

55 Arg Ala Ile Ala Phe Ala Val Gly Lys Met Ala Gln Gln Gln Gly Val
 530 535 540

040055 AM

61

Ala Val Lys Thr Ser Ala Glu Ala Leu Gln Gln Ala Ile Asp Asp Asn
545 550 555 560

5

Phe Trp Gln Ala Glu Tyr Arg Asp Tyr Arg Arg Thr Ser Ile
565 570